

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

Unidad Académica de los Ciclos Profesional y de Posgrado del CCH
Instituto de Investigaciones Biomédicas

**EFFECTO DEL FIERRO EN LA DIFERENCIACION Y
CRECIMIENTO DE *Trypanosoma cruzi*.**

TESIS
que para obtener el grado de
Licenciada en Investigación Biomédica Básica
PRESENTA
Laura del Carmen Vargas Parada

1992

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

CONTENIDO

I RESUMEN	1
II INTRODUCCION	2
- ENFERMEDAD DE CHAGAS EN MEXICO	5
- FIERRO E INFECCION	7
- FIERRO Y <i>Trypanosoma cruzi</i>	8
- FIERRO	9
- FIERRO Y HEMOPROTEINAS	10
- PROTEINAS FERROSULFORADAS	10
- PORFIRINAS	11
III OBJETIVO	13
- OBJETIVOS PARTICULARES	13
IV MATERIALES Y METODOS	15
I. CEPAS	15
II. MANTENIMIENTO DE LAS CELULAS.	15
III. CULTIVO DE <i>Trypanosoma cruzi</i> .	16
IV. HEMATOPORFIRINA.	16
V. FIERRO SOLUBLE	16
VI. EVALUACION DEL CRECIMIENTO.	16
VII. EVALUACION DEL NUMERO DE FORMAS DIFERENCIADAS.	17

VIII. DETERMINACION DE LA CONCENTRACION DE FIERRO EN EL MEDIO DE CULTIVO	17
IX TECNICAS FOTOGRAFICAS	18
V RESULTADOS	19
- CRECIMIENTO DE <i>Trypanosoma cruzi</i> .	19
- LISIS POR COMPLEMENTO DE SUERO ACTIVO HUMANO	19
- EFECTO DEL FIERRO EN EL CRECIMIENTO DE <i>Trypanosoma cruzi</i>	22
- EFECTO DEL FIERRO EN LA DIFERENCIACION DE <i>Trypanosoma cruzi</i>	29
- EFECTO DE LA HEMATOPORFIRINA EN EL CRECIMIENTO Y DIFERENCIACION	34
- EFECTO DEL FIERRO SOLUBLE EN EL CRECIMIENTO Y DIFERENCIACION .	36
- DETERMINACION DE LA CONCENTRACION DE FIERRO SOLUBLE EN EL MEDIO DE CULTIVO DURANTE LA CURVA DE CRECIMIENTO	42
VI DISCUSION	47
VII CONCLUSIONES	54
VIII BIBLIOGRAFIA	56

IX APENDICE	60
1. PREPARACION DE MEDIO LIT	
(Liver Infusion Tryptose)	61
1.1 PREPARACION DEL LIT	62
2. MANTENIMIENTO DE LOS CULTIVOS	62
3. PREPARACION DE HEMATOPORFIRINA	62
4. PREPARACION DEL FIERRO SOLUBLE	63
5. CONTEO EN CAMARA DE NEUBAUER	63
6. TINCION CON GIEMSA	65
7. OBTENCION DE SUERO PARA LISIS	66
8. ENSAYO DE LISIS	66

ABREVIATURAS

LIT Liver Infusion Tryptose

C Control

SH Sin hemina

H2x Hemina dos veces concentrada

HPR Hematoporfirina

SAF Sulfato de amonio férrico

SAH Suero activo humano

PBS Buffer salino de fosfatos

ppm Partes por millón

**"Gold is for the mistress -silver for
the maid-**

**Copper for the craftman cunning
at his trade**

**'Good!' said the Baron, sitting in
his hall,**

**'But iron' -Cold iron- is master of
them all"**

R Kipling

I RESUMEN

El hierro es esencial para el desarrollo celular. Para asegurar su obtención los organismos han desarrollado diversos mecanismos. En el caso de los parásitos estos dependen de las reservas de hierro del hospedero para obtener el hierro necesario para su metabolismo. En estudios previos se encontró que durante una infección el hospedero experimenta una respuesta hipoferrémica que le resulta protectora al privar de hierro a los organismos invasores. La concentración de hierro en el hospedero es determinante durante la infección con *Trypanosoma cruzi*. Poco se sabe sobre cómo contienda el parásito con dicha respuesta protectora del hospedero y qué efecto tiene la falta o exceso de hierro en el parásito. Como un primer paso para comprender esta compleja relación huésped-hospedero se buscó determinar el efecto de diferentes concentraciones de hierro en la diferenciación y crecimiento *in vitro* de *Trypanosoma cruzi*. Para ello, se crecieron células en medios de cultivo con diferentes concentraciones de hierro. Se cuantificó el crecimiento de la población por conteo en cámara de Neubauer y la diferenciación se determinó por la supervivencia de las células al ataque por complemento de suero activo. Se encontró que al variar la concentración de hierro en el medio de cultivo, se modificó tanto la proliferación como la diferenciación celular. Los resultados muestran una primera caracterización de este complejo sistema. Se discuten las posibles implicaciones que puede tener la ausencia o falta de hierro durante el curso de la enfermedad y de la relación huésped-hospedero y se propone un modelo de cómo *Trypanosoma cruzi* podría responder a la falta o exceso de hierro.

II INTRODUCCION

El *Trypanosoma cruzi* es un protoctista (1, 2) hemoflagelado que se encuentra, junto con sus reservorios y vectores, ampliamente distribuido en América: desde el norte de los Estados Unidos hasta la Patagonia. Es agente causal de la **Tripanosomiasis Americana** (o Enfermedad de Chagas), enfermedad que afecta a 18 millones de personas en América (3) (**Fig 1**). Como objeto de estudio, este parásito presenta dos aspectos de sumo interés: i) el biológico y ii) el médico.

i) Desde el punto de vista biológico es interesante, ya que como miembro representativo del género digenético de los **Trypanosoma**, presenta un ciclo de vida alternante entre dos hospederos, uno invertebrado y otro vertebrado.

El vector, invertebrado hematófago (**Triatominos** en general), al picar a un hospedero infectado con *Trypanosoma cruzi*, ingiere **tripomastigotes procíclicos**, los cuales viajan a través de su tracto digestivo. Al llegar a la luz intestinal se diferencian en **epimastigotes** (forma proliferativa en el vector), los cuales se multiplican por fisión binaria, para posteriormente diferenciarse en el intestino del vector en **tripomastigotes metacíclicos** (forma no proliferativa, que infecta al vertebrado). Los **tripomastigotes metacíclicos** se liberan al medio externo junto con el contenido intestinal al defecar el Triatomino sobre el vertebrado (**Fig 2**).

El hospedero vertebrado adquiere la enfermedad si existen lesiones de la capa queratínica de la epidermis (o las genera al rascarse), ó a través de las mucosas, lo que permite así la entrada de los **tripomastigotes metacíclicos**. Una vez en el torrente sanguíneo del hospedero vertebrado los **tripomastigotes metacíclicos** entran a las células, donde se diferencian al estadio de **amastigote** (forma infectiva, proliferativa del vertebrado). Los **amastigotes** pueden infectar células adyacentes o transformarse en

DISTRIBUCION GEOGRAFICA DE LA ENFERMEDAD
DE CHAGAS EN AMERICA
(OMS 1990)



Fig 1.  Zonas afectadas por la Enfermedad de Chagas.

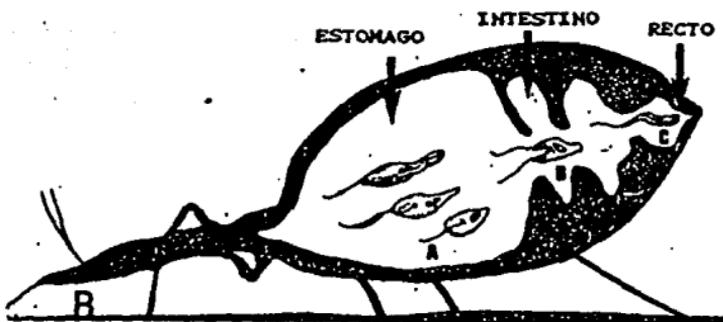
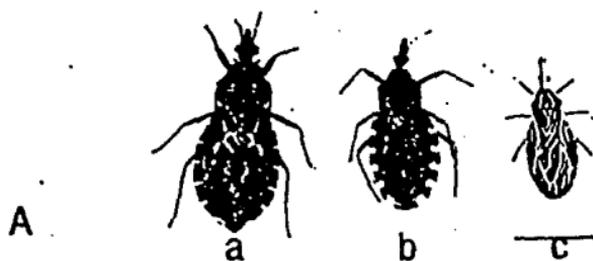


Fig 2. A. Diferentes especies de Triatomíneos que son eficientes vectores de *Trypanosoma cruzi* en Latinoamérica. a) *Panstrongylus megistus*. b) *Triatoma infestans*. c) *Rhodnius prolixus*. B. Los tripomastigotes procíclicos son ingeridos por el vector insecto y se transforman pocas horas después en epimastigotes en el estómago del vector (a). Los epimastigotes se multiplican en el intestino por fisión binaria (b) y eventualmente se diferencian a tripomastigotes metacíclicos en el recto (c), siendo liberados junto con las heces fecales al picar el vector a su hospedero.

tripomastigotes procíclicos, los cuales salen nuevamente al torrente sanguíneo e infectan otras células o, si el vertebrado es picado por un vector, inician nuevamente su ciclo biológico (4) (**Fig 3**). El hospedero también puede adquirir la enfermedad a través de transfusiones sanguíneas, si la sangre se encuentra contaminada con **tripomastigotes procíclicos**.

ii) Desde el punto de vista medico es importante ya que, la enfermedad continúa siendo incurable y se considera que en nuestro continente existen 90 millones de personas en riesgo de contraer la enfermedad, además de los millones de personas que ya la han contraído (3).

Por lo general la enfermedad se divide en tres fases:

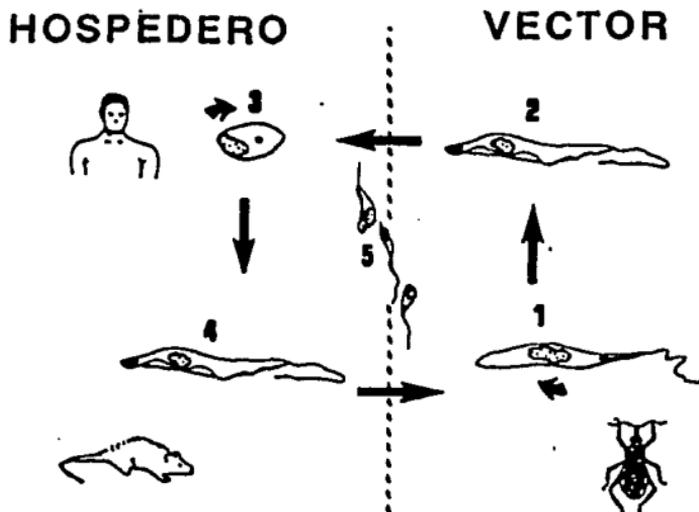
1) La **fase aguda**, la cual en la mayoría de los casos es asintomática o inaparente, pero que puede causar la muerte de aproximadamente un 10 % de los individuos infectados. Cuando existen síntomas, estos son los característicos de una infección generalizada, como fiebre, linfadenopatía, parasitemia y lesión inicial (chagoma).

2) La **fase indeterminada**. La mayoría de los casos agudos de la Enfermedad de Chagas se transforman en un periodo de entre 2 a 3 meses a un estado sub-agudo y de éste, a un estado crónico asintomático, comúnmente llamado fase indeterminada. Alrededor del 40 % de los casos serológicamente positivos se clasifican bajo este grupo cuando sólo se llevan a cabo exámenes de rutina.

3) La **fase crónica**, es en la cual puede ocurrir aumento en el tamaño del corazón, anormalidades electrocardiográficas, aperistalsis y dilatación del esófago y colon (megaesófago y megacolon) (5).

3.1. ENFERMEDAD DE CHAGAS EN MEXICO

Por muchos años se ha creído que la Enfermedad de Chagas no es importante en México y que las cepas y aislados mexicanos de T



NUCLEO



CINETOPLASTO

-
- 1.- EPIMASTIGOTE .
 - 2.- TRIPOMASTIGOTE (METACICLICO)
 - 3.- AMASTIGOTE
 - 4.- TRIPOMASTIGOTE (PROCICLICO)
 - 5.- FORMAS INTERMEDIAS
-

Fig 3. Ciclo de Vida de *Trypanosoma cruzi*.

cruzi son relativamente no patógenos. Esta idea persiste a pesar de que desde 1939 se han reportado casos agudos (6, 7). En 1975, los reportes oficiales de la "Campaña Nacional para Erradicar el Paludismo" mostraron la existencia de 74 casos agudos detectados por la presencia en sangre de formas tripomastigotas (8). Entre 1975 y 1987, fueron reportados 53 nuevos casos (9 a 14). El bajo número de reportes parece deberse a la falta de métodos eficientes de diagnóstico, a que aún en los casos más agudos es difícil encontrar parasitemias patentes y a que los síntomas clínicos más importantes, como el síndrome de Romaña y la aparición de chagomas o de alteraciones ganglionares, tienden a ser de relativa corta duración y poco reconocidos por los médicos rurales.

El grupo de la Dra Salazar, (Facultad de Medicina, UNAM) reportó que entre 1949 y 1985 se detectaron por serología (fluorescencia indirecta, fijación del complementó y hemoaglutinación indirecta) 398 casos crónicos de una muestra total de 6, 672 personas (10, 11, 15 a 19). Esto sugiere una prevalencia promedio de poco menos del 6 %, lo que resulta consistente con las frecuencias de infección reportadas para otros países de Latinoamérica, las cuales son generalmente del 2 al 8 % (20).

3.2. FIERRO E INFECCION

Debido a que los requerimientos de fierro para el crecimiento son similares para células de animales, vegetales y de microorganismos (aproximadamente de 0.4 a 4.0 μM) (25), a primera vista parecería poco práctico utilizar como mecanismo de defensa antimicrobiano el privar de fierro a las propias células. Sin embargo, tanto mamíferos como aves, reptiles y quizás todos los vertebrados, hacen considerables ajustes metabólicos durante una infección, restringiendo así a los microorganismos invasores del fierro esencial (26).

La hipoferreremia ocurre por un mecanismo todavía no comprendido que no sólo suprime el retorno del fierro de los compartimentos del sistema reticuloendotelial (27), sino que incluso

aumenta el flujo del hierro extracelular hacia estos mismos sitios de almacenamiento. Esta respuesta del hospedero resulta de beneficio cuestionable en la defensa contra parásitos intracelulares que se multiplican en el propio sistema reticuloendotelial, donde utilizan las reservas intracelulares de hierro del hospedero.

Las investigaciones clínicas realizadas en Africa, sobre dos grupos de sujetos deficientes en hierro (28) mostraron que, al comparar con el grupo no tratado, el grupo al cual se le administró hierro exógeno desarrolló significativamente más infecciones sintomáticas con patógenos tanto facultativos como obligados. Estas observaciones sugirieron que en la ausencia de reservas normales de hierro en los tejidos, el crecimiento y patogenicidad de los parásitos intracelulares fue restringido, mientras que la restitución de estas reservas promovió su crecimiento y patogenicidad.

3.3. FIERRO Y *Trypanosoma cruzi*

En 1984, Lalonde y Holbein (29), estudiaron el efecto del hierro en el curso de la infección experimental con *T cruzi* en ratones. Las reservas de hierro en el tejido fueron alteradas al administrársele al ratón ya fuera un dextrán de hierro o desferrioxamina B (quelante de hierro) junto con una dieta deficiente en hierro. Los efectos del exceso ó ausencia de hierro en el desarrollo de la enfermedad correlacionaron directamente con las observaciones antes realizadas: A mayor concentración de hierro en las reservas intracelulares, mayor tasa de mortalidad; a menor concentración de hierro en las reservas intracelulares disminuyó la tasa de mortalidad (aunque los niveles de parasitemia mostraron ser iguales a los de los controles) y aumento el tiempo de supervivencia promedio del ratón. En ese mismo año, Loo y Lalonde (30) al trabajar sobre la misma idea, utilizaron como modelo experimental la infección *in vitro* de macrófagos peritoneales con amastigotes de *T cruzi*. A estos cultivos se les agregó desferrioxamina B y desferrioxamina previamente quelada con hierro.

Las conclusiones fueron semejantes a las de Lalonde (29): La desferrioxamina B disminuyó la velocidad de crecimiento de los

amastigotes al disminuir las reservas celulares de hierro, mientras que la desferrioxamina previamente quelada no tuvo ningun efecto. Recientemente se reportó (31) que los **amastigotes** de *Trypanosoma cruzi* presentan receptores para la transferrina de humano, los cuales son reconocidos por anticuerpos dirigidos contra el propio receptor de transferrina del humano. Esto hace pensar que el parásito capta el hierro esencial para su metabolismo a través de la endocitosis de moléculas de transferrina del hospedero, siendo esta endocitosis mediada por esos receptores a transferrina. La presencia de dichos receptores (de aproximadamente 200 KDa) sólo se demostró en el estadio de **amastigote**. No se encontraron receptores similares en **trpomastigotes**. La forma **epimastigote** aún no ha sido estudiada.

Fuera de esta primera evidencia que trata de explicar de qué manera logra el parásito obtener del medio el hierro esencial para su supervivencia, poco se conoce de esta importante relación huésped-hospedero.

3.4. FIERRO

El hierro desempeña funciones importantes en procesos tales como:

- El flujo de electrones a través de la cadena respiratoria (32).
- Como componente de proteínas ferrosulfuradas (como los citocromos) (21).
- La activación de oxígeno molecular, nitrógeno e hidrógeno (21).
- La descomposición de derivados tóxicos de oxígeno, tales como peróxido y superóxido (21).
- La síntesis de DNA (21).

3.4.1. FIERRO Y HEMOPROTEINAS

La obtención de hierro del medio constituye un paso crucial para prácticamente todos los organismos. El hierro en su estado ferroso (Fe^{+2}) es, a cualquier pH, más soluble que en su estado férrico, (Fe^{+3}), lo cual trae como consecuencia que el Fe^{+2} sea más fácilmente absorbido por un organismo (21, 22). Sin embargo, sólo los organismos anaerobios estrictos pueden satisfacer sus necesidades de hierro al absorber el Fe^{+2} soluble que se encuentra en su medio de crecimiento. Los microorganismos aerobios y los anaerobios facultativos sintetizan compuestos altamente afines al Fe^{+3} , que se conocen como sideróforos, cuya función es introducir este elemento a la célula. Este transporte es mediado por receptores (23). Otros factores que intervienen en la movilización del hierro son la **transferrina** y la **ferritina**.

La **ferritina** es una proteína que se encuentra principalmente en el interior de las células de hígado, bazo y médula ósea. Su forma es prácticamente esférica, con una cavidad central que contiene al hierro en forma de complejos de óxido férrico hidratado, arreglados como celdas hexagonales. Cada molécula de ferritina puede contener de 2,500 hasta 5,000 átomos de hierro; éstos se introducen en la cavidad central mediante poros que atraviesan la molécula proteica. La ferritina, de acuerdo con el modelo más aceptado, está constituida por 24 subunidades, cada una con un peso molecular de 19,000 Da (24). La función de esta proteína es almacenar el hierro celular.

La **transferrina** es la proteína especializada en el transporte de hierro dentro del organismo. La transferrina está constituida por una sola cadena polipeptídica, cuya estructura tridimensional da lugar a dos sitios específicos capaces de unir, cada uno, un átomo de hierro. Su peso molecular es de alrededor de 80,000 Da; es una glicoproteína (21).

3.4.2. PROTEINAS FERROSULFORADAS

Este tipo de proteínas contienen hierro y azufre ácido-lábil en cantidades equimolares. Actúan como transportadoras de electrones

y experimentan procesos reversibles de óxido-reducción de hierro $+2$ a hierro $+3$ ($\text{Fe} + 2 \rightleftharpoons \text{Fe} + 3$).

Citocromos

Los citocromos son proteínas que contienen grupos ferro-porfirina y cuya función es transferir electrones; se encuentran solamente en células aerobias. En su mayoría, se localizan en la membrana mitocondrial interna, donde actúan en secuencia para transportar electrones originados en varios sistemas de deshidrogenasas, hasta el oxígeno molecular. Otros citocromos se encuentran en el retículo endoplásmico, e intervienen en las reacciones de hidroxilación especializadas (33).

3.4.3. PORFIRINAS

Son proteínas formadas por cuatro anillos pirrólicos interunidos por grupos metino. Las porfirinas se designan y clasifican con base en los sustituyentes que forman las cadenas laterales, como los grupos acetilo, propionilo, metilo, vinilo y etilo. La mayoría de las porfirinas forman complejos tetravalentes con un ión metálico central (Mg^{+2} , Fe^{+2} , Fe^{+3}) quelado tanto por uniones covalentes como no covalentes (34). Las porfirinas más importantes son el grupo **HEMO** (ferroprotoporfirina IX), que contiene Fe^{+2} , la **HEMINA** (ferriprotoporfirina IX), que contiene Fe^{+3} y la clorofila que contiene Mg^{+2} .

El **HEMO** es el grupo prostético de la hemoglobina (Fig 4) y de la mioglobina, las cuales unen reversiblemente oxígeno e intervienen en el transporte de oxígeno en los animales. El **HEMO** y sus derivados también median el transporte de electrones por los citocromos (34). La **HEMINA** es el grupo prostético de las peroxidases y las catalasas (Fig 4) (34). Desde hace mucho tiempo la **hemina** ha sido utilizada en medios de cultivo para *T. cruzi*. Se utiliza como una fuente importante de hierro (35).

La **HEMATOPORFIRINA** es una porfirina cuya característica principal es que no contiene ningún ión metálico central (Fig 4).

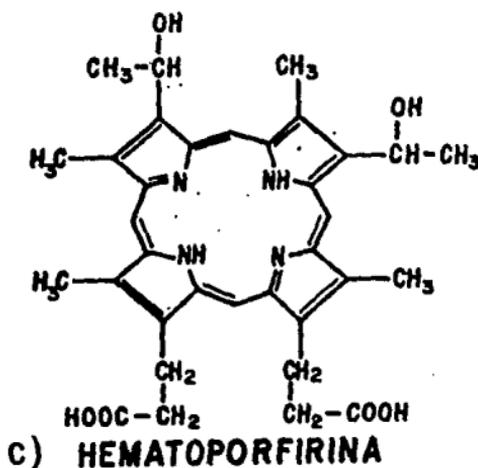
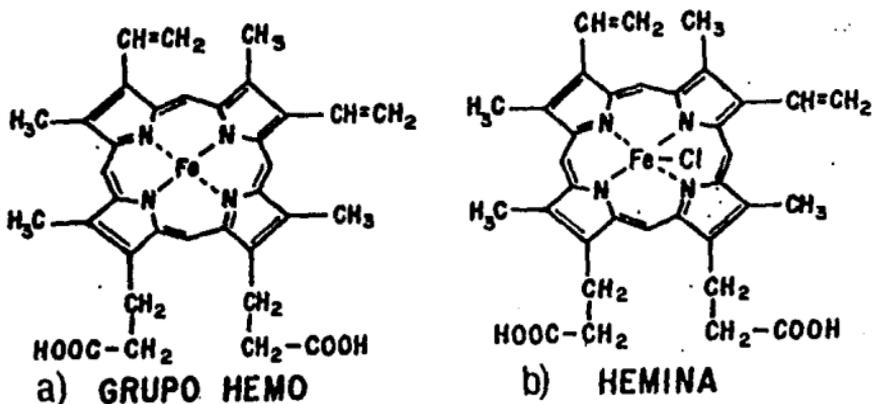


Fig 4. a) Hemo, grupo prostético de la hemoglobina. b) Hemina, componente del medio de cultivo de *Trypanosoma cruzi*. Grupo prostético de peroxidasa y catalasa. c) Hematoporfirina, porfirina que no contiene ningún ión metálico central.

III OBJETIVO

El hierro es un elemento importante para el metabolismo celular, por ello, los microorganismos parásitos han desarrollado diversos mecanismos que les permiten obtener del hospedero el hierro necesario para su supervivencia. *T cruzi* no es la excepción. En 1990 Lima y Villalta (31) reportan la existencia de un receptor a transferrina de humano en los amastigotes de *T cruzi*, sin embargo este es el único reporte sobre la manera en que este parásito pudiera obtener el hierro esencial.

En los estudios realizados *in vivo* e *in vitro* sobre el efecto del hierro durante la infección con *T cruzi* (29, 30) se vió que la concentración intracelular de este elemento en el hospedero es determinante durante la infección. Se desconoce como afecta el hierro al parásito y de qué manera lo obtiene cada estadio celular .

El objetivo de este trabajo fue estudiar el efecto del hierro en el crecimiento y diferenciación de *Trypanosoma cruzi*, bajo condiciones experimentales controladas (*in vitro*). Para medir el efecto del hierro en el metabolismo del parásito se tomaron dos factores fundamentales en su supervivencia: el crecimiento y la diferenciación.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Determinar el efecto de diferentes concentraciones de hierro en el medio de cultivo, en el crecimiento y diferenciación de *T cruzi*. Para ello utilizamos a la **hemina** (ferriprotoporfirina IX que contiene Fe^{+3} como ión metálico central), componente del medio de cultivo, como principal medida de la cantidad de hierro en el cultivo. Se utilizó a la **hemina**, ya que junto con la infusión de hígado, son los dos principales componentes del medio de cultivo que aportan hierro, de los cuales sabemos ahora que ambos contribuyen en una proporción similar. Sin embargo, la cantidad de hierro proporcionada por la

hemina es un valor constante y conocido mientras que el de la infusión de hígado es variable.

2. Determinar si es la estructura porfírica, el fierro o ambos los responsables de la respuesta celular. Se utilizó a la **hematoporfirina**, porfirina cuya característica principal es que no contiene ningún ión metálico central, para descartar que el efecto observado se deba al anillo porfírico y no al fierro y como fierro soluble, **sulfato de amonio férrico**, para determinar si el anillo porfírico es necesario o no en el transporte del fierro hacia el interior de la célula.

3. Determinar cuánto fierro toma el parásito del medio de cultivo durante su crecimiento y diferenciación en las distintas condiciones experimentales.

IV MATERIALES Y METODOS

I. CEPAS

En este estudio se utilizaron dos cepas y una clona:

i) La cepa La Cruz Jalisco, C4 (37), aislada de *Triatoma barberi* en la localidad de la cual tomó su nombre, donada por el Dr Jorge Tay de la Facultad de Medicina de la UNAM, México.

ii) La cepa Yucatán H4, Yuc-H4, aislada de humano en el estado de Yucatán y cedida por el Dr Jorge Zavala del Instituto Hideyo Noguchi, Mérida, Yucatán.

iii) La clona Sylvio X10-7 (37) también aislada de humano y donada al laboratorio por el Dr Roberto Hernández del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM, México.

II. MANTENIMIENTO DE LAS CELULAS.

Los organismos fueron mantenidos en medio axénico LIT (Liver Infusion Tryptose, por sus siglas en inglés) suplementado con 10 % de suero fetal bovino (GIBCO) y 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (3.8×10^{-5} M) de hemina (Ferricloruro del ácido 8-tetrametil, 2,4-divinilporfín -6,9- dipropiónico) (SIGMA) (35) en frascos Falcon de 25cm² a 28°C y subcultivadas semanalmente.

1. Una cepa es un aislado mantenido en laboratorio y que ha sido caracterizado de acuerdo a los parámetros establecidos por la OMS como: velocidad de crecimiento en cultivo, infectividad y parasitemia en ratón y chinche, así como patrones isoenzimáticos y zimodemas característicos.

2. Una clona es un cultivo obtenido a partir de una sola célula y por consiguiente sus características génicas son exactamente iguales.

III. CULTIVO DE *Trypanosoma cruzi*.

Como fuente de organismos para los experimentos, se utilizaron cultivos en fase *plateau* tardía (10 días). Se sembraron 5×10^6 células/ml en LIT control (C) ($25 \mu\text{g/ml}$), en LIT sin hemina (SH) y en LIT suplementado con doble cantidad de hemina (H2x) ($50 \mu\text{g/ml}$) a un volumen final de 5 ml y 5 mm de profundidad.

IV. HEMATOPORFIRINA.

Se suplementó medio LIT, sin hemina, con hematoporfirina (HPR) (ácido 1, 3, 5, 8 -tetrametil- 2, 4- bis (α -hidroxietil) -porfín-6,7-dipropiónico) (ICN) a una concentración final de 3.8×10^{-5} M. En este medio se sembraron células y se midió el crecimiento y número de formas diferenciadas, se usaron como controles cultivos C y SH.

V. FIERRO SOLUBLE

Se suplementó medio LIT, sin hemina, con sulfato de amonio férrico (SAF) a una concentración final de 3.8×10^{-5} M. Se sembraron células en medios de cultivo con una concentración de SAF equivalente a la hemina, a los cuales se les denominó SAF control; en cultivos con doble concentración de SAF denominados SAF 2x y como controles, cultivos con hemina C y cultivos SH. Se midió el crecimiento y el número de células resistentes a la lisis.

VI. EVALUACION DEL CRECIMIENTO.

El crecimiento se determinó por conteo diario en cámara de Neubauer con un microscopio óptico Carl Zeiss con un objetivo 40x.

VII. EVALUACION DEL NUMERO DE FORMAS DIFERENCIADAS.

LISIS POR COMPLEMENTO DE SUERO ACTIVO HUMANO

Para determinar el porcentaje de formas diferenciadas (**epimastigotes, tripomastigotes** o formas intermedias) presentes en el medio de cultivo, se utilizó el ensayo lítico de Nogueira et al (36), con las siguientes modificaciones: Se preparó una dilución v/v con suero activo humano (SAH) proveniente de donadores sanos. Se incubó toda la noche a 28°C. Al final de la incubación se determinó por conteo en cámara de Neubauer el número de formas resistentes a la lisis y se estimó la viabilidad de las células por tinción con azul de Trypano. El número inicial de células incubadas se tomó como el 100 %. Antes de realizar los experimentos con el fierro se hicieron curvas de lisis para cada una de las cepas y la clona utilizadas. Para ello se utilizaron cultivos de fase logarítmica (3 a 4 días) con el fin de contar con poblaciones de 95 a 100% de **epimastigotes** en las cuales se comprobó la actividad lítica del suero.

VIII. DETERMINACION DE LA CONCENTRACION DE FIERRO EN EL MEDIO DE CULTIVO

Se utilizó un Espectrofotómetro de Absorción Atómica PERKIN ELMER modelo 372 para determinar la concentración de fierro inicial de cada uno de los medios de cultivo C, SH, H2x y HPR (día 0). Se sembraron células (5×10^6 células/ml) en cada uno de estos medios para obtener una curva de crecimiento. En los días 2, 4, 6 y 8 de la curva de crecimiento se tomaron alícuotas (500 μ l), que se centrifugaron para eliminar las células. Se midió posteriormente la concentración de fierro en los sobrenadantes de los cultivos C, H2x, SH y HPR para determinar el porcentaje de fierro absorbido por los parásitos en cada una de las condiciones mencionadas. La longitud de onda utilizada para medir el fierro es 248.5 nm y detecta de 0 a 5 ppm de fierro. Se construyó una curva patrón con una solución estándar de fierro (Aldrich).

IX TECNICAS FOTOGRAFICAS

Se hicieron preparaciones secadas al aire y teñidas con Giemsa de los experimentos, que posteriormente fueron fotografiadas en un microscopio Carl Zeiss con un objetivo 40x mas una lupa 20x. Las fotografías fueron tomadas en rollo blanco y negro KODAK Plus X.

Para poder realizar preparaciones fijas mas representativas y comparables entre sí, se tomó cada vez alícuotas de 5, 10 y 15 μ l de cada cultivo y se gotearon sobre el portaobjetos a una distancia constante. Los Giemsas presentados son preparaciones con la misma alícuota inicial de cultivo de manera que las comparaciones entre las preparaciones son lo más similares posible.

Todos los experimentos se realizaron mínimo por triplicado. Los resultados mostrados son los más representativos.

V RESULTADOS

CRECIMIENTO DE *Trypanosoma cruzi*.

Para determinar el efecto del fierro en el crecimiento de *T cruzi*, se procedió a establecer las características de las curvas de crecimiento normal de cada cepa y clona. En las tres se observó que el crecimiento de las poblaciones del parásito describe una curva sigmoideal la cual se divide comúnmente en tres fases: lag, logarítmica y *plateau*. Tanto las cepas como la clona presentan poblaciones de entre 95 a 99% de formas **epimastigotes** durante la fase media logarítmica, mientras que al llegar al *plateau* de la curva presentan un porcentaje de diferenciación variable.

En la **Fig 5** se muestra la curva de crecimiento de la cepa C4 Jalisco, donde se detalla qué estadio celular del parásito se observa normalmente en cada fase.

La **Fig 6** es una preparación secada al aire y teñida con Giemsa, tomada el día 5 de cultivo. En ella se puede observar que el estadio celular predominante es la forma **epimastigote**.

LISIS POR COMPLEMENTO DE SUERO ACTIVO HUMANO ,

Después de establecer las condiciones de crecimiento, se procedió a probar la actividad del suero humano con el cual se realizarían los ensayos de lisis de los experimentos con fierro.

Desde hace mucho tiempo, se ha reportado (35) que el suero activo tiene la habilidad de lisar selectivamente a los **epimastigotes** mientras que los **tripomastigotes** se mantienen intactos, este fenómeno es dependiente de la activación de la vía alterna del complemento. Esta respuesta diferencial a la lisis se debe a que las formas resistentes no permiten el ensamble eficiente del complejo C3-convertasa, al ser su membrana celular incapaz de unir el factor

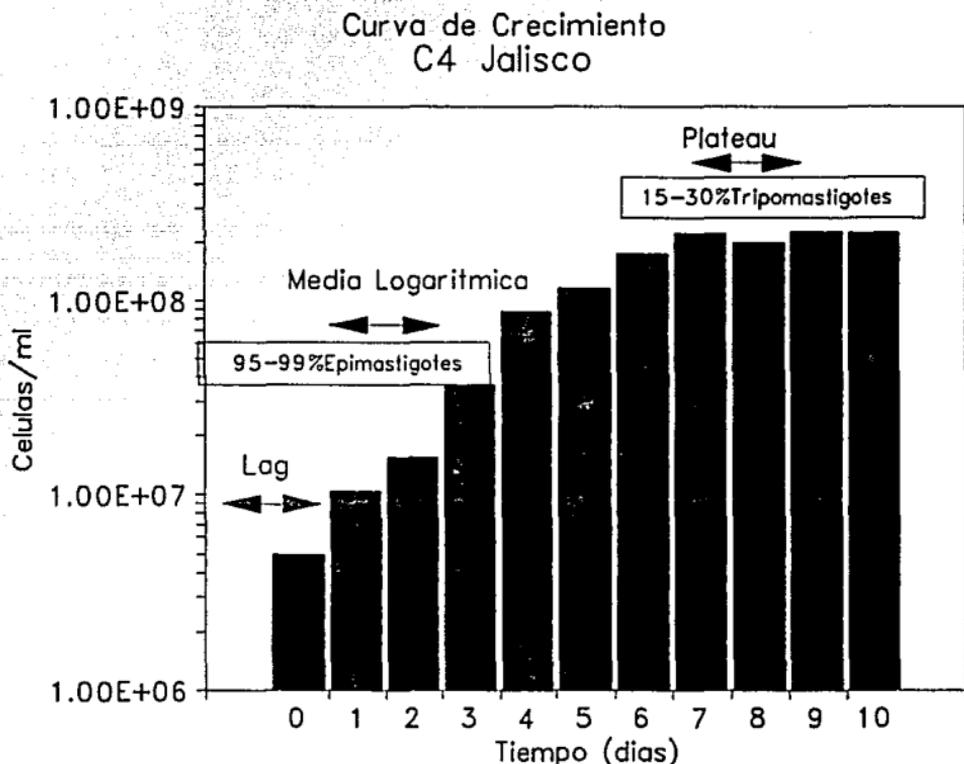


Fig 5. Curva de crecimiento de la cepa C4 Jalisco en medio LIT a 28°C. En la curva se distinguen tres fases: Lag, media logarítmica y *plateau*. En la fase media logarítmica la población consiste en un 95 a 99% de epimastigotes. En el *plateau* la población consiste en epimastigotes y de un 15 a 30% de tripomastigotes.



Fig 6. Preparación secada al aire y teñida con Giemsa. La preparación se tomó de un cultivo de la cepa C4 Jalisco en la fase media logarítmica. El estadio celular predominante es la forma epimastigote.

B (38, 39). Las células resistentes a la lisis no son únicamente los **tripomastigotes**, sino también las formas en transición ó intermedias (40, 41), que han modificado lo suficiente la composición de su membrana como para sobrevivir a la lisis por complemento y, por ello, son también potencialmente infectivas y pueden desempeñar un papel importante durante la infección. Esta propiedad diferencial entre **epimastigotes** y formas infectivas (metacíclicas), nos permite determinar en las poblaciones mezcladas del medio de cultivo los diferentes estadios celulares.

El ensayo de lisis se realizó en células procedentes de un cultivo en fase media logarítmica (5 días) Se escogió un cultivo en esa fase ya que la mayor parte de la población son **epimastigotes**. Si el suero posee el 100% de su actividad, entonces debe lisar prácticamente del 90 al 100% de las células. A los 120 minutos, el 95% de las células se lisaron. Después de este tiempo ya no se observa efecto lítico del suero sobre las células. Estas células capaces de resistir el ataque del suero activo humano (SAH) son aquellas que han comenzado su proceso de diferenciación y han modificado ya la composición de su membrana. Las curvas de lisis de la cepa Yuc-H4 y de la clona Sylvio X10-7 (datos no mostrados) dieron resultados similares a los obtenidos con la cepa C4: después de dos horas ya no hay células sensibles a lisis y el número de las resistentes se mantiene igual por las siguientes 22 horas. Por ello se eligió 24 horas como tiempo estándar para realizar los ensayos posteriores de lisis.

En la **Fig 7** se muestra la curva de lisis de la cepa C4 Jalisco.

La **Fig 8** muestra Giemsas preparadas a lo largo del ensayo de lisis de la cepa C4 Jalisco.

EFFECTO DEL FIERRO EN EL CRECIMIENTO DE Trypanosoma cruzi

Una vez establecidas las condiciones de trabajo se procedió a iniciar los experimentos con la hemina. Los experimentos fueron realizados con la cepa C4 Jalisco. Se encontró que el crecimiento de la población se modificó según la concentración de hierro (hemina)

Supervivencia a Lisis
C4 Jalisco

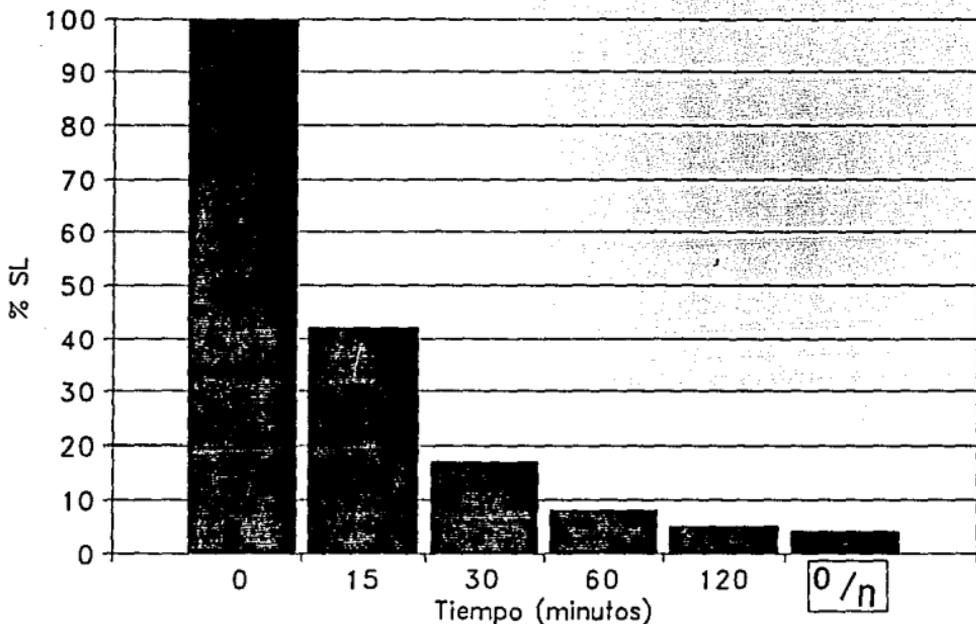


Fig 7. Prueba de la actividad del complemento sérico sobre células de la cepa C4 Jalisco. Para este y todos los ensayos posteriores se utilizó suero activo procedente de donadores sanos. Las células, en su mayoría *epimastigotes*, se tomaron de la fase media logarítmica. Después de 120 minutos, el 94% de las células fueron lisadas. El número de células resistentes se mantuvo 24 horas después, igual que a los 120 minutos del ensayo.

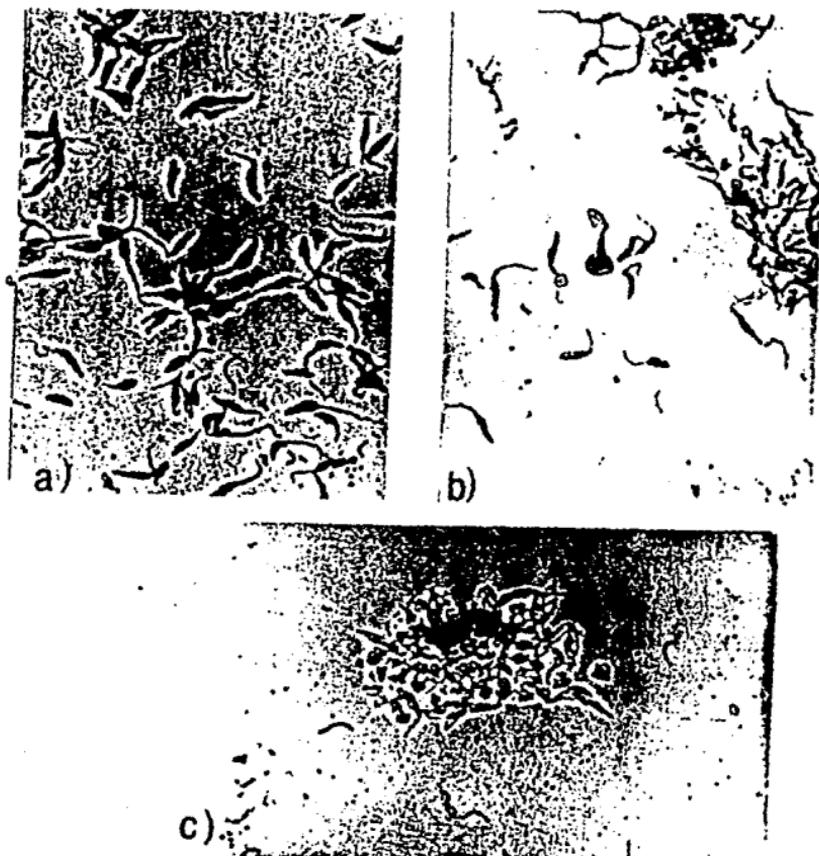


Fig 8. Preparaciones secadas al aire y teñidas con Giemsa. Se tomaron muestras a diferentes tiempos durante el ensayo de lisis de la cepa C4 Jalisco. Este ensayo se llevó a cabo con células procedentes de la fase media logarítmica. a) 0 minutos. Se observa a la población celular antes de ponerla en contacto con el suero activo. Las células están intactas y el estadio celular que predomina es el de **epimastigote**. b) 30 minutos. Se pueden observar agregaciones celulares así como fragmentos de células que ya han sido lisadas (extremo superior derecho de la fotografía). Aún se observan algunas células intactas en el centro de la fotografía. c) 120 minutos. Se observan restos celulares predominantemente.

utilizada en el medio de cultivo. Los cultivos con mayor concentración de fierro (H2x) incrementaron su crecimiento respecto a los controles y aquellos que no contenían hemina (SH) crecieron menos que el control (Fig 9).

Para saber si el efecto que observamos era o no dependiente de la cepa utilizada, se probó el mismo ensayo en una cepa diferente. Se escogió la cepa Yuc-H4 debido a que su procedencia era distinta a la de la C4. La C4 provenía de vector (*Triatoma barberi*), mientras que la Yuc-H4 fue aislada de una paciente.

En la cepa Yuc-H4 se observó (Fig 10) una respuesta celular similar a la encontrada con la cepa C4. Sin embargo, fue sólo hasta el día 5 de la curva cuando el cultivo SH disminuyó su crecimiento por abajo del C. En el caso de la cepa C4 el crecimiento del cultivo SH se encuentra por abajo del C desde el día 2.

Una posible explicación al hecho de que el cultivo SH de la cepa de humano responde más lentamente que la de vector a la falta de fierro, es que se sabe que existe una gran heterogeneidad entre las diferentes cepas y aún entre las clonas de *T. cruzi*. Por ejemplo, se ha reportado que existen diferencias en la concentración interna de fierro entre clonas provenientes de una misma cepa (42). De acuerdo a los datos obtenidos, se podría pensar que la cepa Yuc-H4 posee una concentración interna de fierro mayor que la cepa C4, de tal manera que, al restringir la disponibilidad de este elemento, tarda más tiempo en consumir sus propias reservas y, por consiguiente, en experimentar los efectos ocasionados por la ausencia de este metal.

Finalmente, se decidió realizar el mismo ensayo sobre una clona. En el caso de la clona, aunque la falta de fierro también disminuyó el crecimiento (Fig 11), no se observaron diferencias importantes entre el cultivo C y el H2x. Esto quiere decir que aunque la ausencia de fierro en el medio ocasiona un menor crecimiento en todos los casos, la respuesta a mayores concentraciones de fierro es variable entre las cepas y la clona.

Curva de Crecimiento C4 Jalisco

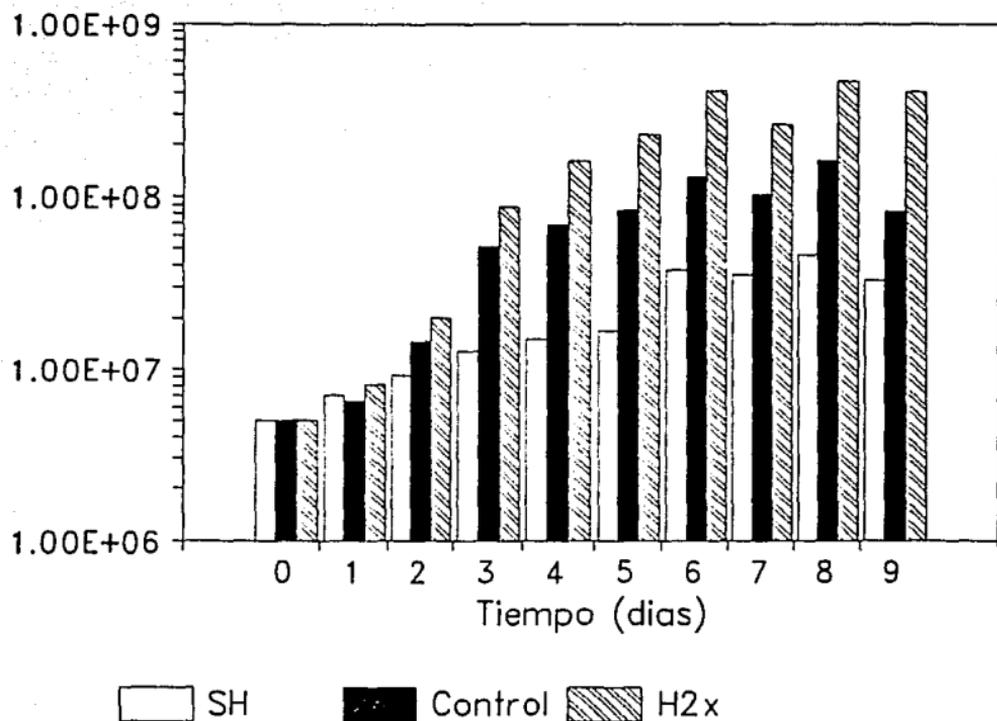


Fig 9. Curva de crecimiento de la cepa C4 Jalisco en medio LIT bajo diferentes concentraciones de hemina. El cultivo se inició con un inóculo de 5×10^6 cel/mL, a partir de un cultivo de 10 días. La proliferación celular se cuantificó por conteo en cámara de Neubauer.

Curva de Crecimiento Yucatán-H4

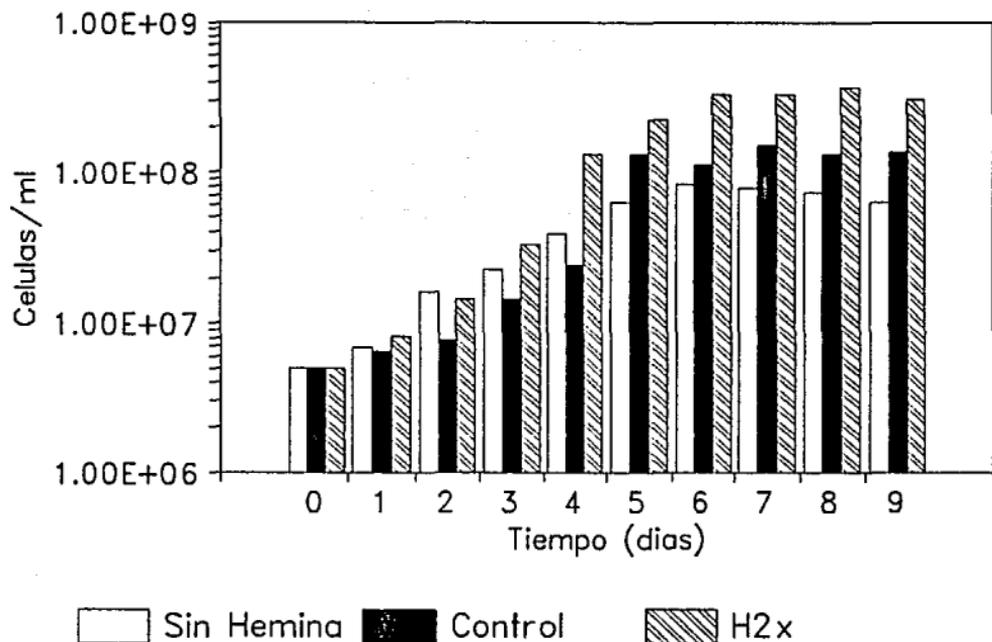


Fig 10. Curva de crecimiento de la cepa Yuc-H4 en medio LIT bajo diferentes concentraciones de hemina. El cultivo se inició con un inóculo de 5×10^6 cel/ml a partir de un cultivo de 10 días.

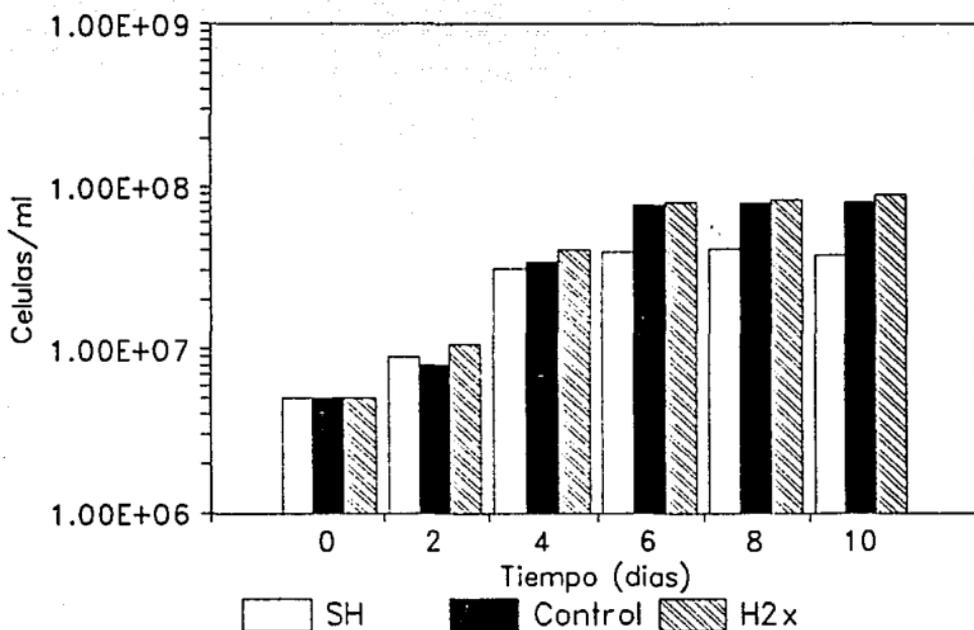
Curva de Crecimiento
Sylvio X10-7

Fig 11. Curva de crecimiento de la clona Sylvio X10-7 en medio LIT bajo diferentes concentraciones de hemina. El cultivo se inició con un inóculo de 5×10^8 cel/ml a partir de un cultivo de 10 días.

En la **Fig 12** se muestran Giemsas tomadas de cultivos de la cepa C4 Jalisco crecidas bajo diferentes concentraciones de hemina. Las preparaciones se tomaron el día 5 de la curva de crecimiento.

EFFECTO DEL FIERRO EN LA DIFERENCIACION DE Trypanosoma cruzi

Las curvas de crecimiento se iniciaron con inóculos de células que provenían de un cultivo de 10 días. Se escogió el día diez, porque como puede observarse en la curva estándar (**Fig 5**), para este día del cultivo hay en la población de un 10 a un 30 % de formas que sobreviven al ataque por complemento. Se utilizaron estos cultivos para poder observar qué efecto tenía el subcultivo de estas células en medios con diferentes concentraciones de hierro. Normalmente se observa que las formas infectivas en presencia de nutrientes se transforman en **epimastigotes** para así reiniciar su crecimiento (J Zavala Castro, PM Salazar, comunicación personal, corroborado por J Rubio et al). Los cultivos C de las **Fig 13 a 15** muestran lo anterior. Al entrar en contacto con un medio rico en nutrientes, las poblaciones celulares inician nuevamente su crecimiento. Como el estadio celular que se divide es la forma **epimastigote**, la cual es incapaz de sobrevivir al ataque por SAH, se observa una disminución en el número de células resistentes a la lisis. Los máximos porcentajes de lisis se alcanzan entre los días 3 a 6 de la curva de crecimiento (**Fig 13 a 15**), siendo precisamente en esos días cuando los cultivos alcanzan el máximo número de formas **epimastigotes**. Conforme envejece el cultivo, la aparición espontánea de formas **tripomastigotes** comienza a detectarse como un incremento en el número de formas resistentes a la lisis. En el caso de la cepa C4 Jalisco (**Fig 13**), el cultivo SH mantiene hasta el día 4 un número de células diferenciadas parecido al del inóculo inicial. Ese número decae posteriormente, y es precisamente entre estos días (5 a 7) (**Fig 9**) cuando se observa un ligero incremento en el crecimiento de la población. El alto crecimiento observado en los cultivos H2x (**Fig 9 a 11**) correlaciona con una disminución en el número de células resistentes a la lisis (**Fig 13 a 15**). Sin embargo, a partir del día 3 se inicia un aumento en el porcentaje de células resistentes, el cual

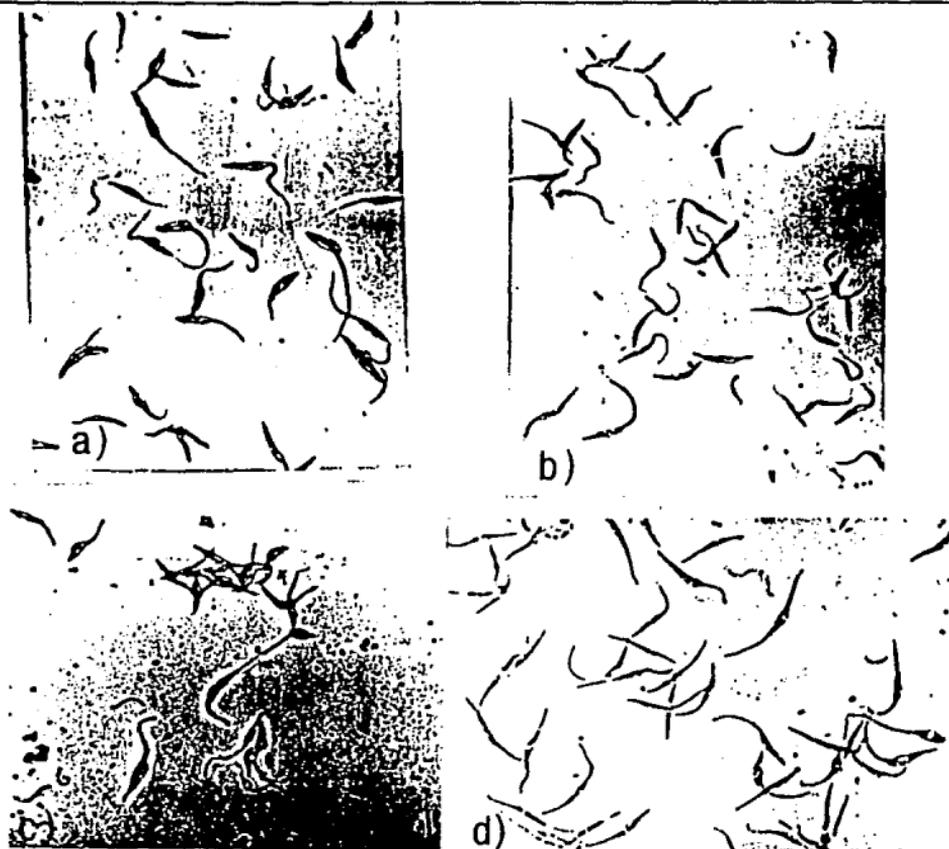


Fig 12. Preparaciones secadas al aire y teñidas con Giemsa. Las preparaciones se tomaron de los cultivos de la cepa C4 Jalisco crecidos bajo diferentes concentraciones de hemina. Las preparaciones mostradas fueron tomadas el día 5 de cultivo. a) C. Células crecidas en medio LIT. La población celular consiste principalmente de formas **epimastigotes**. b) SH. Células crecidas en medio LIT sin hemina. Las células presentan un aspecto alargado y se aprecia una población considerable. c) HPR. Células crecidas en medio LIT sin hemina suplementado con hematoporfirina. Las células están en estado de **epimastigote**, se observa poca proliferación celular y hay agregaciones celulares. d) H2x. Células crecidas en medio LIT con doble concentración de hemina. Las células presentan un aspecto sumamente alargado y hay una densidad celular importante.

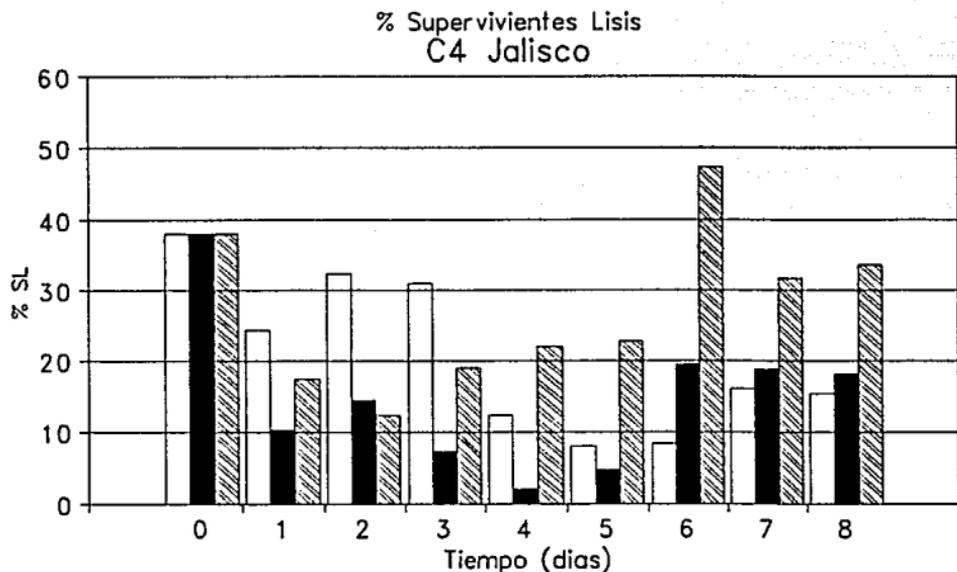


Fig 13. Porcentaje de células que resistieron la acción del suero activo humano. Las células se crecieron en medio LIT bajo diferentes concentraciones de hemina. Un inóculo de cada cultivo se sometió a la acción del suero durante 24 horas. Después de este tiempo se contó el número de células intactas utilizando para ello una cámara de Neubauer. La viabilidad celular se corroboró utilizando azul de Trypano. Este ensayo se realizó para cada día de la curva de crecimiento.

% Supervivientes Lisis
Yucatán-H4

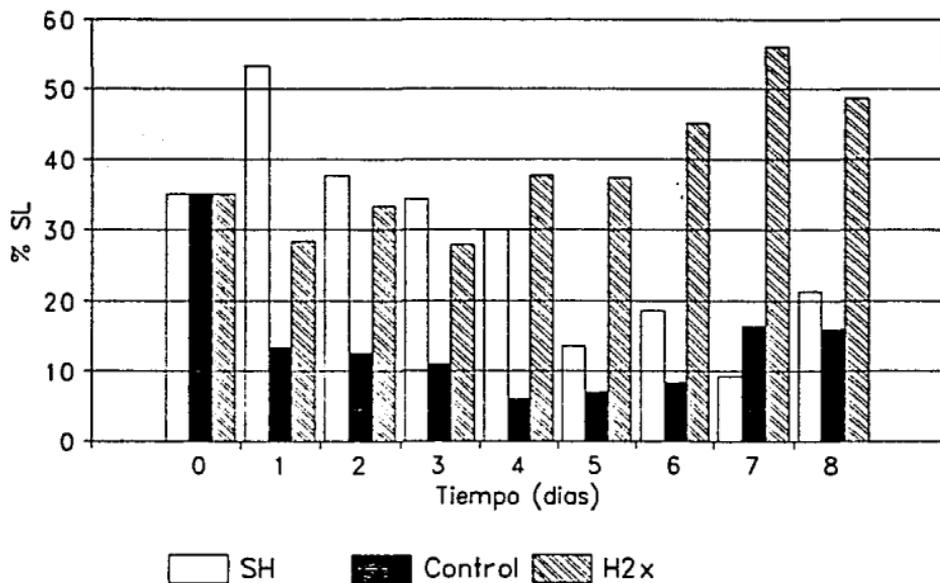


Fig 14. Porcentaje de células que resistieron la acción del suero activo humano. El ensayo de lisis se realizó bajo las mismas condiciones que las de la cepa C4 Jalisco.

% Supervivientes Lisis
Sylvio X10-7

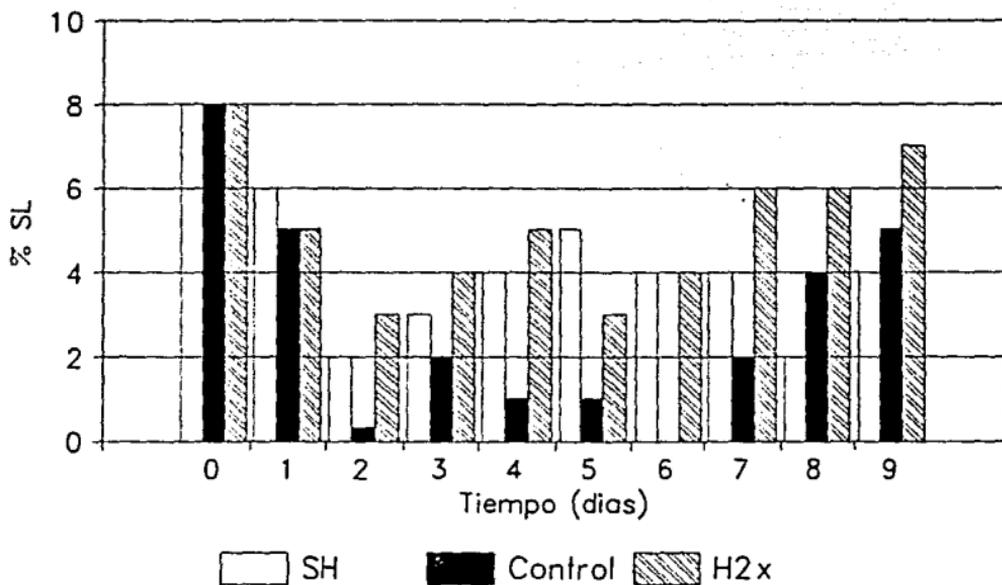


Fig 15. Porcentaje de células que resistieron la acción del suero activo humano. El ensayo de lisis se realizó bajo las mismas condiciones que las de la cepa C4 Jalisco.

continuará incrementándose por encima de los cultivos C y SH hasta alcanzar el máximo número el día 6.

El cultivo SH de la cepa Yuc-H4 (**Fig 14**), mostró un importante aumento en el número de células resistentes al SAH durante los primeros días del ensayo (del 35 al 53%). Este número decae posteriormente aunque se mantiene durante casi todo el ensayo por encima del control. El cultivo H2x mantuvo un número de células resistentes a lisis de entre un 25 a un 35%. Este porcentaje se incrementó a partir del día 4, alcanzando el máximo número de células resistentes al SAH el día 7 del cultivo.

La clona (**Fig 15**) mostró un porcentaje espontáneo de diferenciación muy bajo (8%) comparado con el de las cepas (del 30 al 35%). Igual que en los casos anteriores el cultivo sin hemina se mantiene por encima del control, y decae posteriormente a partir del día 4. El cultivo H2x mantiene a través del experimento un alto número de células resistentes a la lisis por SAH. Este número es mayor que el C a partir del día 2 de cultivo, y superior al de las células SH a partir del día 7.

En la **Fig 16** se muestran las Giemsas de los cultivos C, SH y H2x de la cepa C4 Jalisco. Las Giemsas se prepararon el día 5 del cultivo después de los ensayos de lisis por SAH.

EFFECTO DE LA HEMATOPORFIRINA EN EL CRECIMIENTO Y DIFERENCIACION

Para determinar si el incremento en crecimiento y diferenciación era producido por el hierro, decidimos separar los dos posibles efectores de la respuesta: el anillo pirrólico y el hierro. Para ello se utilizó a la hematóporfirina (HPR) como sustituyente de la hemina en el medio de cultivo. La HPR, como se mencionó en la introducción, no contiene ningún ion metálico central (**Fig 4**), de tal manera que si la estructura porfírica es la responsable del efecto observado, la HPR debería reproducir los datos obtenidos previamente con la hemina.

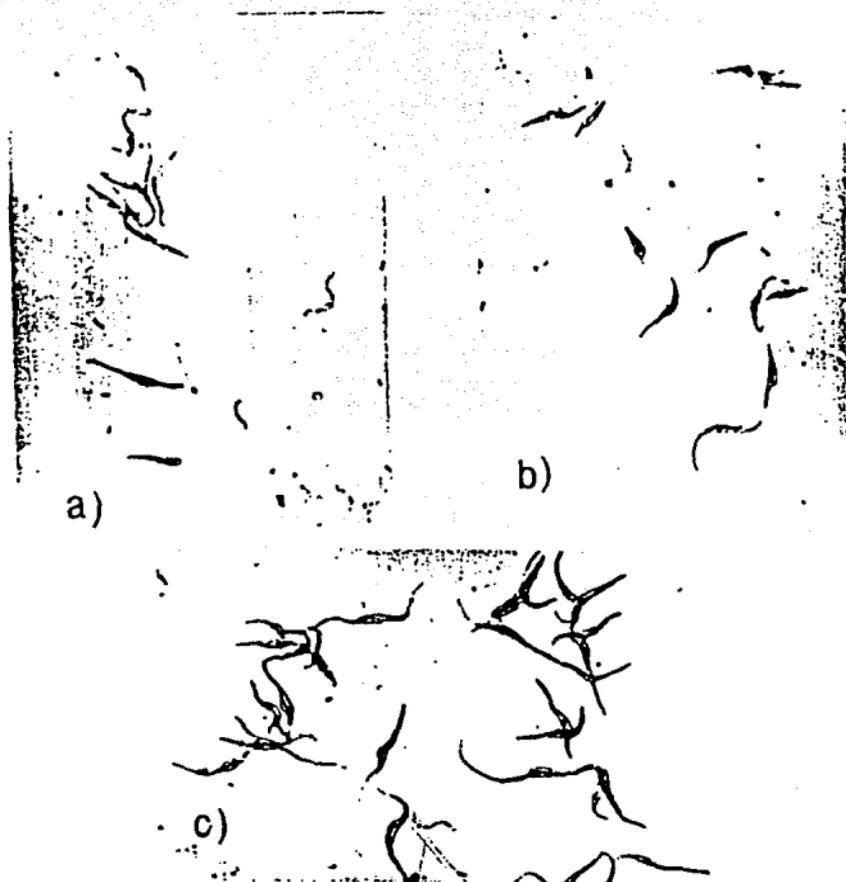


Fig 16. Preparaciones secadas al aire y teñidas con Giemsa. Se tomaron muestras de los ensayos de IIsIs de los cultivos C, SH, y H2x de la cepa C4 Jalisco. Las preparaciones mostradas corresponden al día 5 del experimento. a) C. Células crecidas en medio LIT. Se observan restos celulares y grupos de células que presentan alteraciones morfológicas como resultado de la actividad lítica del suero. b) SH. Células crecidas en medio LIT sin hemina. Se observan algunas células de apariencia alargada que resistieron la IIsIs por complemento del suero. c) H2x. Cultivos crecidos en medio LIT con doble concentración de hemina. Hay una gran cantidad de células que resistieron la acción lítica del suero a pesar de encontrarse en fase media logarítmica.

A partir de estos experimentos, los ensayos se realizaron únicamente con la cepa C4 Jalisco. Una vez que hayamos concluido esta fase de caracterización (que incluirá estudios más minuciosos sobre el metabolismo), se retomará el trabajo con la cepa y la clona de procedencia humana previamente utilizadas, más una clona procedente del vector y quizás con formas **amastigotes**.

Como podemos observar en la **Fig 17**, la hematoporfirina por sí sola no fue capaz de mantener el ritmo de crecimiento observado en el control, su comportamiento es semejante al del cultivo SH (**Fig 9**). Aparentemente la hematoporfirina actúa como quelante e impide que la célula tome del medio el hierro que provee la infusión de hígado

El número de células de los cultivos HPR resistentes al SNA no fue mayor del 30%. Sin embargo, este número si se mantuvo por encima de los valores encontrados en el cultivo control (**Fig 18**).

Nuevamente la forma de la curva se parece a la de los cultivos SH.

Esto parece indicar que el anillo pirrólico *per se* es incapaz de inducir la respuesta observada cuando el metal está presente en el anillo (hemina).

En la **Fig 19** se muestra los Giemsas tomados el día 5 de la curva de crecimiento de los cultivos mantenidos en medio LIT (C) y los mantenidos en medio LIT sin hemina suplementados con hematoporfirina (HPR).

La **Fig 20** muestra los Giemsas tomados durante el ensayo de lisis de los cultivos crecidos en medio LIT (C) y los crecidos en medio LIT sin hemina suplementados con hematoporfirina (HPR).

EFFECTO DEL FIERRO SOLUBLE EN EL CRECIMIENTO Y DIFERENCIACION .

La **Fig 21** muestra los resultados obtenidos al cultivar la cepa C4 Jalisco con hierro soluble en lugar de utilizar hemina. Se observa que el hierro en forma soluble no induce un mayor crecimiento aún cuando

Curva Crecimiento
C4 Jalisco Hematoporfirina

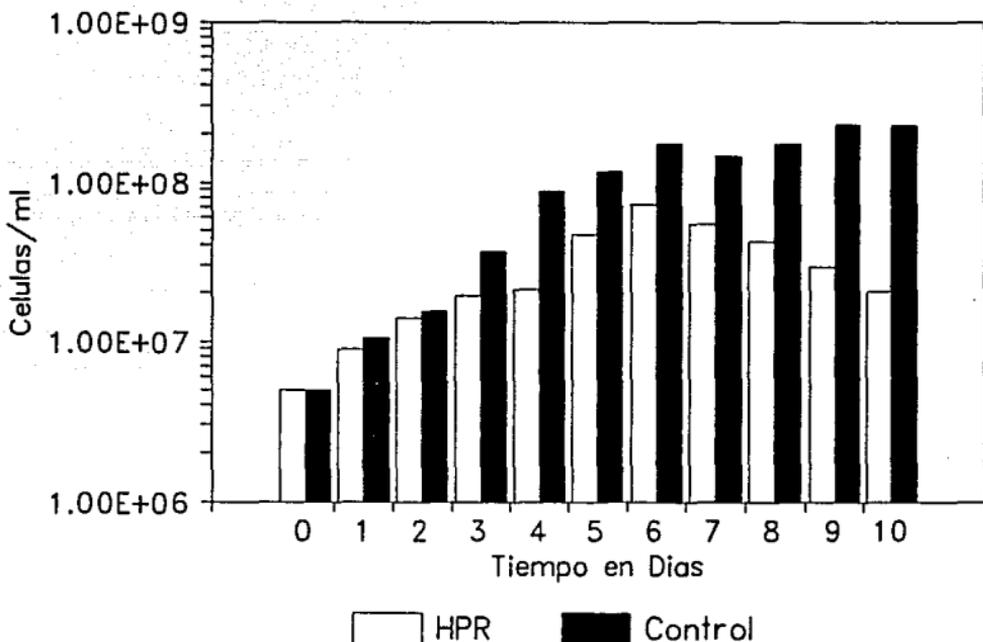


Fig 17. Curva de crecimiento de la cepa C4 Jalisco en medio LIT o en medio LIT sin hemina suplementado con hematoporfirina. El cultivo se inició con un inóculo de 5×10^6 cel/ml a partir de un cultivo en fase *plateau* (diez días), mantenido en medio LIT.

% Supervivientes Lisis
C4 Jalisco Hematoporfirina

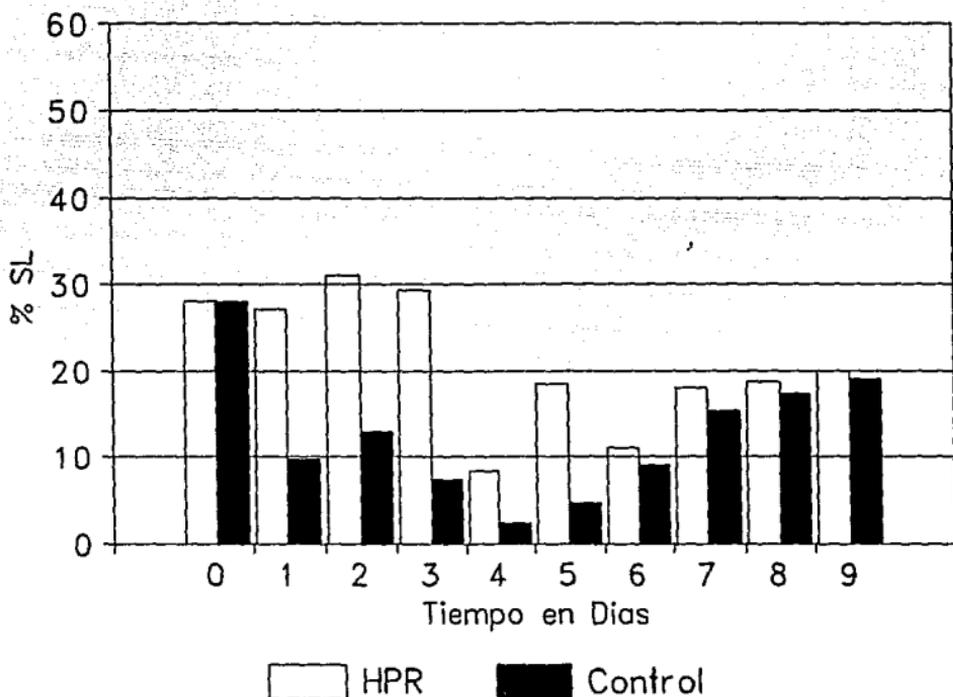


Fig 18. Porcentaje de células que resistieron la acción del suero activo humano. Las células procedían de cultivos mantenidos en medio LIT y de cultivos mantenidos en medio LIT sin hemina suplementado con hematoporfirina. Se tomaron alícuotas de cada cultivo y se sometieron a la acción del suero durante 24 horas. Después de este tiempo, se contó el número de células intactas utilizando una cámara de Neubauer. La viabilidad de las células se corroboró con azul de Trypano. Este ensayo se realizó para cada día de la curva de crecimiento.

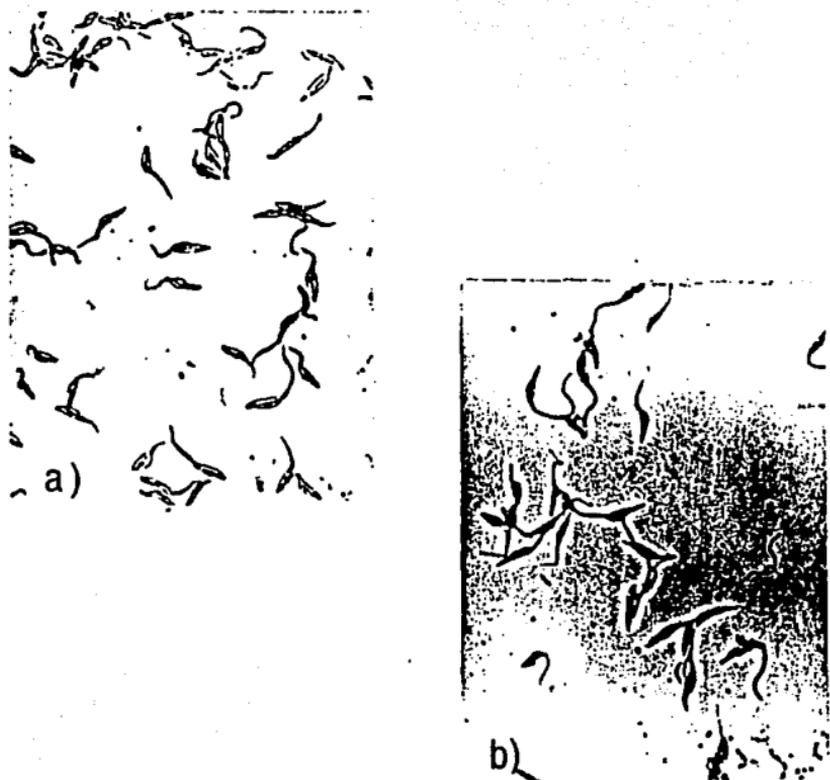


Fig 10. Preparaciones sacadas al aire y teñidas con Giemsa tomadas de la cepa C4 Jalisco. Las preparaciones se tomaron el día 5 de la curva de crecimiento. a) C. Células crecidas en medio LIT. Se observa una gran proliferación celular que consiste principalmente de células en estado de epimastigote. b) HPR. Células crecidas en medio LIT sin hemina suplementado con hematoporfirina. Hay poca proliferación celular y se observa un cierto alargamiento de las células.

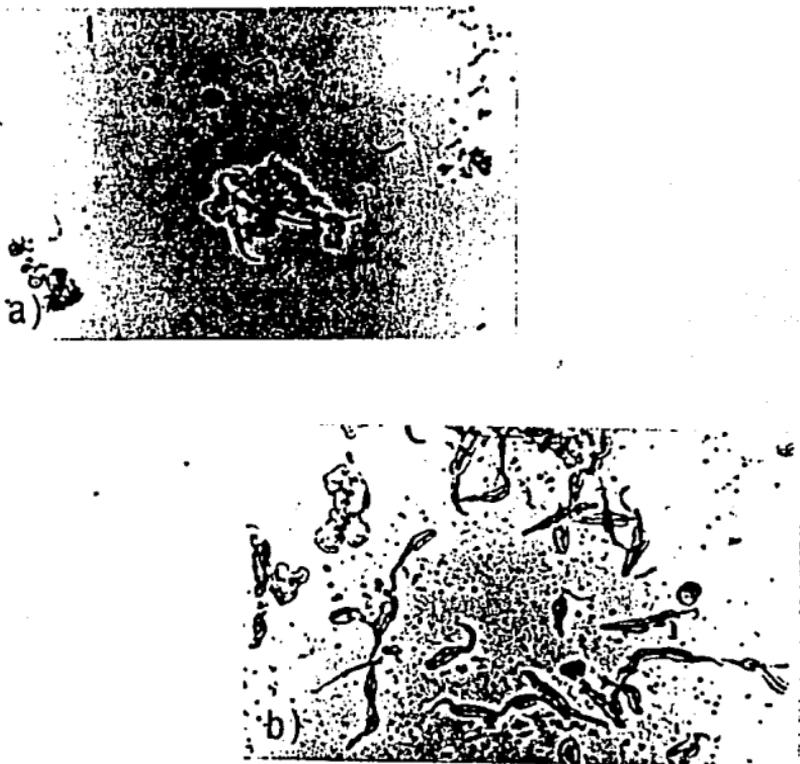


Fig 20. Preparaciones de la cepa C4 Jalsco, secadas al aire y teñidas con Giemsa. Las preparaciones se tomaron el día 5 del experimento. a) C. Células crecidas en medio LIT. El cultivo fue casi totalmente lisis. Se aprecian restos celulares en el centro de la fotografía. Hay algunas células intactas entre los restos celulares. b) HPR. Células crecidas en medio LIT sin hemina suplementado con hematoporfirina. Hay restos celulares aunque se observan células que resistieron a la lisis.

Curva de Crecimiento C4 Jalisco Fierro Soluble

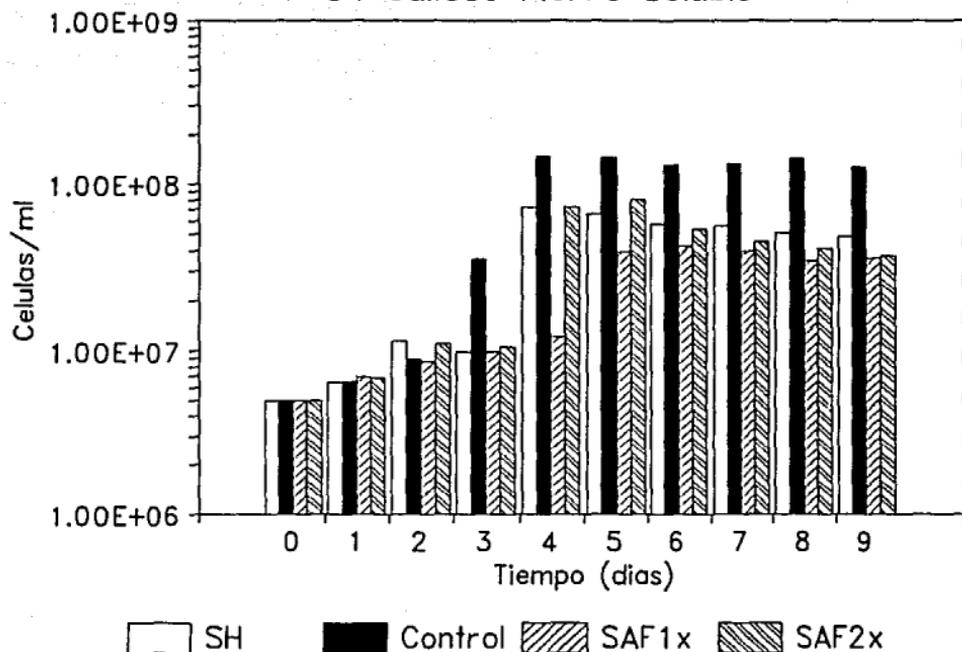


Fig 21. Curva de crecimiento de la cepa C4 Jalisco en medio LIT o en medio LIT sin hemina suplementado con sulfato de amonio férrico concentrado una o dos veces. El cultivo se inició con un inóculo de 5×10^6 cel/ml a partir de un cultivo en fase *plateau* (diez días), mantenido en medio LIT.

se utiliza a concentraciones 2x. Lo que si se puede apreciar es que existen diferencias entre el SAF (sulfato de amonio férrico) control y el SAF 2x. Entre los días 4 a 6, el cultivo SAF 2x tiene un crecimiento mucho mayor que el SAF control. El cultivo con sulfato de amonio férrico 2x tuvo un crecimiento muy parecido al del cultivo SH. El cultivo SAF control muestra, a partir del día 5, un incremento en el número de células, que para finales del *plateau* alcanza los niveles del SAF 2x y del cultivo SH. Si partimos de la suposición de que la célula es incapaz de utilizar este hierro en forma soluble, ya sea una o dos veces concentrado, entonces se convierte en un problema el explicar porqué existen diferencias en crecimiento entre el cultivo SAF C y SAF 2x. En la Fig 22 se muestra el efecto del hierro soluble en el número de células resistentes a lisis. Es evidente que el hierro soluble por sí solo tampoco es capaz de promover la diferenciación celular, la cual se mantiene dentro de los niveles de las células control (5 a 20 %). Nuevamente se observa que el cultivo SH presenta un máximo número de células resistentes a lisis el día 2, número que disminuye posteriormente, aunque sólo hasta el día 6 es menor que el control.

DETERMINACION DE LA CONCENTRACION DE FIERRO SOLUBLE EN EL MEDIO DE CULTIVO DURANTE LA CURVA DE CRECIMIENTO.

En la Fig 23 se muestra la curva patrón obtenida con los estándares de hierro. Se construyó por regresión lineal la mejor recta posible sobre los datos obtenidos.

La Fig 24 muestra la concentración de hierro en el sobrenadante de los cultivos C, SH, HPR y H2x de la cepa C4 Jalisco. El hierro del sobrenadante disminuye cuando los parásitos se encuentran en etapa de proliferación. Esta disminución en la concentración del hierro del sobrenadante se interpreta como que el parásito lo está tomando del medio. Debe considerarse que el parásito puede estar tomando efectivamente el hierro del medio ó puede estar siendo únicamente adsorbido en su membrana. Lo que si es claro es que mientras el parásito crece disminuye el hierro del sobrenadante. Esa disminución es proporcional a la disposición de hierro en el medio. Se encontró

% Supervivencia a Lisis
C4 Jalisco Fierro Soluble

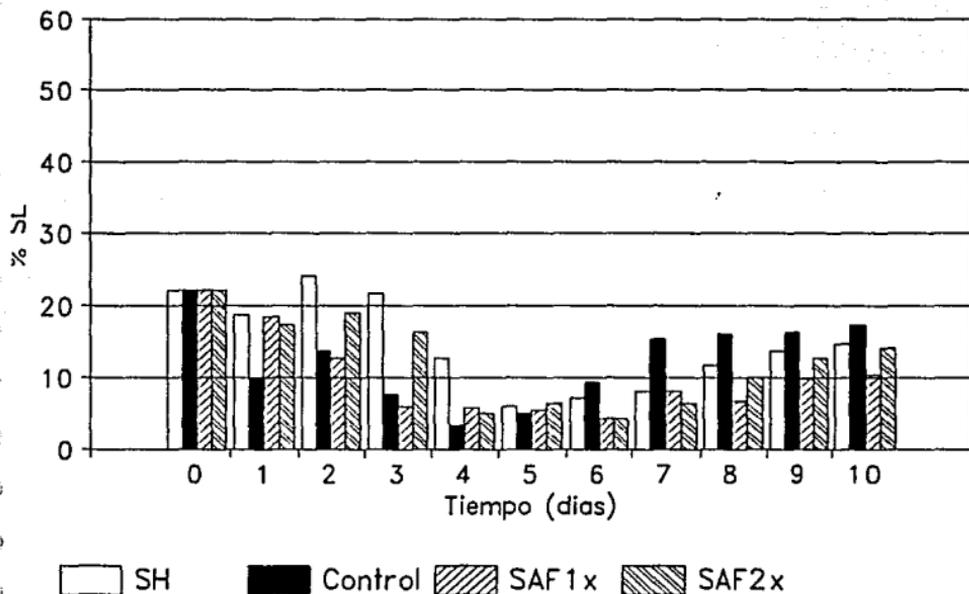


Fig 22. Porcentaje de células que resistieron la acción del suero activo humano. Las células fueron crecidas en medio LIT, en medio LIT sin hemina y en medio LIT sin hemina suplementado con sulfato de amonio férrico concentrado una o dos veces. Las células fueron tratadas bajo las mismas condiciones que las del ensayo de supervivencia a lisis de la cepa C4 Jalisco.

CURVA PATRON

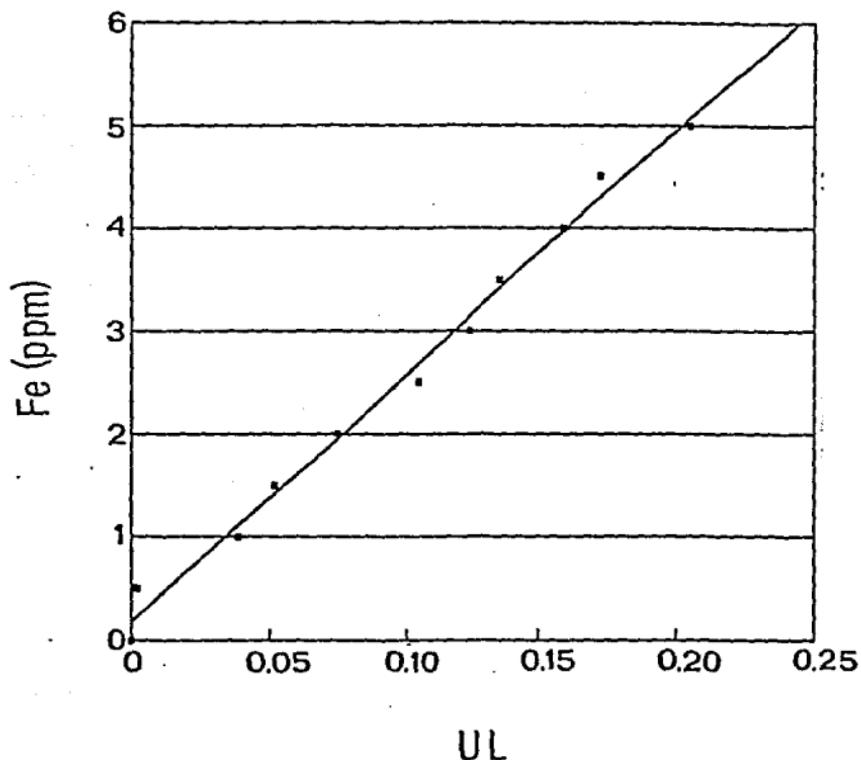


Fig 23. Curva patrón realizada con estándares de hierro de concentración conocida. La absorbancia fue detectada en un espectrofotómetro de absorción atómica PERKIN-ELMER. La lectura se realizó a 248.5 nm y la sensibilidad de detección es de 0 a 5 ppm.

Incorporación de Hierro en Crecimiento C4 Jalisco

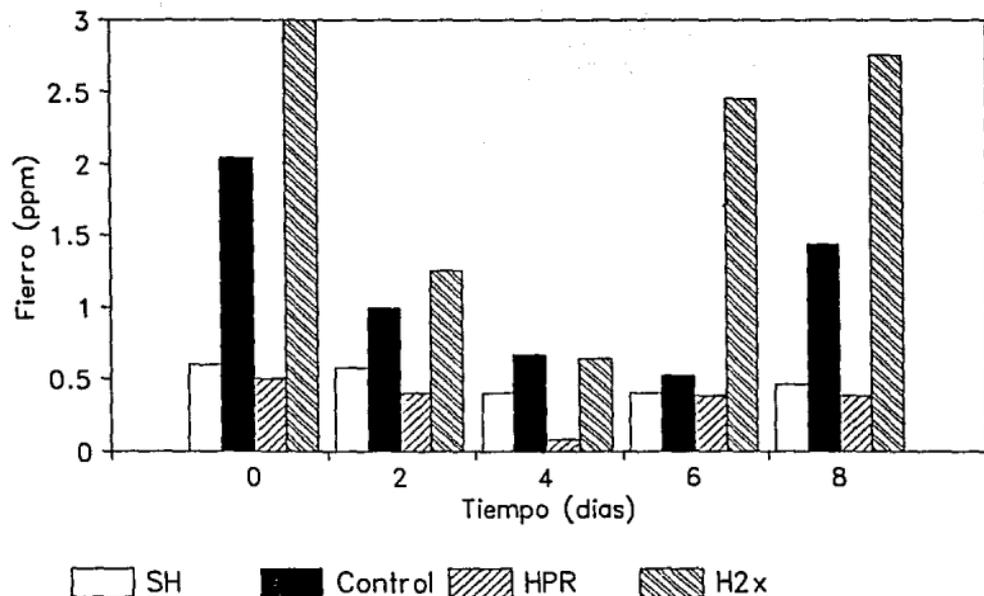


Fig 24. Concentración de hierro en el sobrenadante de los cultivos SH, C, HPR y H2X de la cepa C4 Jalisco. Para la determinación se tomaron muestras del sobrenadante de cada cultivo en los días indicados y se midió la concentración de hierro en el espectrofotómetro de absorción atómica.

que una vez iniciado el proceso de diferenciación las células dejan de tomar el hierro del medio de cultivo y comienza a detectarse un aumento en el hierro del sobrenadante. Este aumento de hierro en el sobrenadante es mayor mientras mayor es el número de células resistentes a lisis observadas en cada cultivo.

VI DISCUSION

Los resultados demostraron que el hierro, según la concentración a la que se encuentre, es capaz de modificar la velocidad de crecimiento de la población celular. Su ausencia disminuye de manera importante el crecimiento. Se encontró que al aumentar el número de células resistentes a la lisis por SAH aumenta la concentración de hierro de hierro del medio de cultivo, y que durante la etapa proliferativa (media logarítmica) esta concentración disminuye.

Se descartó al anillo porfírico como posible efector de la respuesta ya que, por sí solo, fue incapaz de reproducir la respuesta celular observada con la hemina. Los datos experimentales obtenidos en cultivo con hierro soluble muestran que aunque el hierro por sí solo es incapaz de inducir la respuesta y de que aparentemente requiere una estructura porfirínica para penetrar en la célula, existe algún efecto dependiente de la concentración de hierro soluble utilizada, que puede ser capaz de modificar el crecimiento. Esto se observa al comparar el crecimiento de los cultivos con SAF a diferentes concentraciones. El cultivo con mayor concentración de hierro soluble crece más que el de menor concentración. Por ello no podemos descartar por ahora, que concentraciones mayores de hierro soluble puedan desencadenar una respuesta semejante a la observada con la hemina.

Las células de mamífero acumulan hierro a través de la unión de transferrina a receptores de superficie membranal altamente afines ó a través de una ruta independiente de la transferrina que incluye la toma de hierro orgánico a través de un sistema membranal de transporte (43). Aparentemente la regulación del sistema de transporte de hierro no dependiente de transferrina es distinta a la del sistema dependiente de transferrina (44). En *Trypanosoma cruzi* se

detectó en membrana de formas **amastigotes** un receptor para transferrina de humano (30). El hecho de que este tipo de sistemas de transporte y comunicación sean muy conservados, a lo largo de la escala evolutiva, hace pensar que es muy probable que *T cruzi* también cuente con este tipo de transporte de fierro independiente de transferrina.

Los trabajos del grupo de Kaplan (43, 44) encontraron que el sistema de transporte de fierro no regulado por transferrina es independiente de los requerimientos de fierro por el cultivo y de su estado de crecimiento.

Es posible que *T cruzi* posea diferentes mecanismos para obtener el fierro dependiente de las condiciones a las que se encuentre. Para continuar sobre este punto debe realizarse un ensayo cinético y un seguimiento de la localización del metal.

Finalmente los resultados obtenidos por espectrofotometría de absorción atómica al analizar la concentración de fierro soluble en el medio de cultivo, muestran que durante la fase proliferativa disminuye la concentración de fierro soluble del medio. Esto se interpreta como que las células durante dicha proliferación tienen una gran avidez por este metal, mientras que al iniciarse los diversos cambios metabólicos que culminan con la diferenciación celular, se observa un aumento en el fierro soluble del medio. Se asume que el fierro es expulsado por las células, esta expulsión coincide con el aumento en el número de células resistentes a lisis. A mayor número de éstas células, mayor concentración de fierro en el sobrenadante. Podría ocurrir que el aumento de la concentración de fierro en el medio se deba a que se comiencen a romper células como resultado del envejecimiento del cultivo. Sin embargo, no se observa ningún tipo de lisis celular en los cultivos y el cultivo no es tan viejo como para presentar lisis celular.

En este estudio se detectan dos tipos de respuesta que parecen ser independientes uno de otro: Por un lado, tenemos el efecto que de la ausencia de hierro en las células (cultivos **SH** y **HPR**), con su bajo crecimiento, su alto número de células resistentes a lisis durante los primeros días de cultivo y ninguna variación significativa en la toma y expulsión de hierro de la célula.

Por otro lado, tenemos el efecto que produce el hierro durante la proliferación normal del parásito y a mayores concentraciones de este elemento en el medio (cultivos **C** y **H2x**). Existe un aumento en la incorporación de hierro a la célula durante la proliferación. Esta incorporación de hierro es proporcional al hierro disponible en el medio. Los cultivos **H2x** inician más tempranamente la expulsión de hierro de sus células. Esta expulsión coincide con la máxima aparición de células resistentes a lisis. En el caso de los cultivos control, la expulsión de hierro ocurre más tarde, y se acompaña con un incremento en el número de células resistentes a la lisis.

El segundo tipo de respuesta observada, es la que parece estar directamente regulada por hierro y es sobre esta respuesta sobre la que se continuará el trabajo. Para explicar los datos obtenidos se propone un modelo en el cuál el hierro puede actuar sobre la célula en una de dos formas:

a) como el inductor directo en el proceso que desencadena la respuesta al participar por ejemplo, en la síntesis de ferroproteínas y citocromos, en transporte de electrones y respiración celular.

b) al actuar sobre algún metabolito que es el que finalmente desencadena la reacción necesaria para aumentar la velocidad de proliferación y la diferenciación.

Las células bacterianas, de hongos y de otros microorganismos adquieren las cantidades apropiadas de metales clave (hierro,

manganeso y zinc) al iniciarse el cambio de metabolismo primario al secundario. Existe evidencia (45) de que estos micronutrientes esenciales participan en la regulación de la expresión de genes responsables de la síntesis de metabolitos secundarios y/o de alteraciones morfofisiológicas asociadas con la diferenciación celular. Esto nos hace pensar que la entrada de hierro a la célula puede actuar como una señal que desencadena una serie de fenómenos que culminan en la activación o síntesis de uno o varios metabolitos que funcionan como señales intracelulares. Una vez que la concentración de hierro en la célula ha llegado a un valor crítico, la síntesis de dicho metabolito activa algún otro proceso celular que se encarga de sacar al hierro de la célula, quizá como metaloproteínas, o a través de algún sistema de transporte activo. Esta expulsión puede ser resultado del metabolismo celular, o quizá, al ser excretado, entonces funcionar como inductor de la diferenciación, como en el caso de *Dictyostelium* (46), el cual utiliza factores solubles para regular su morfogénesis y su diferenciación celular. Muchos de estos procesos están controlados por rutas de transducción de señales que utilizan receptores acoplados a proteínas G.

En algunos sistemas, el hierro se requiere para la producción de metabolitos secundarios de carácter proteico o de sintetisas de pequeñas moléculas; en otros sistemas, el hierro inhibe esta producción. Si en el cultivo el metal clave está presente en menor cantidad que la que inhibe o desinhibe el proceso secundario, entonces se requerirá más elemento para la actividad regulatoria. En cambio, si la cantidad ya existente es excesiva, esta cantidad será reducida por quelación, precipitación o expulsión de la célula, así se permite que el metal ejerza su función. En otros casos una pequeña concentración del metal inhibe al sistema, mientras que una mayor concentración lo estimula (45).

En nuestro sistema encontramos que funciona al revés. Una alta concentración del metal en la célula inhibe el proceso de

diferenciación, aunque la proliferación aumenta, mientras que una menor concentración celular lo estimula.

Este tipo de comportamiento podría explicarse si tratamos de imaginar las características del metabolito inductor. Si pensamos que se trata de una proteína reguladora, y que esta proteína posee dos sitios diferentes de unión al metal, entonces podemos tratar de explicar como funciona el sistema. Cuando el metal se encuentra a bajas concentraciones, se combina con la proteína en un sitio de alta afinidad. Cuando el metal se encuentra en altas concentraciones se une al segundo sitio, de menor afinidad. La unión del hierro a la proteína modifica su configuración y así se activa de manera diferente según el sitio al que se una el hierro. Esto podría explicar porqué el hierro desencadena dos tipos de respuesta diferentes: proliferación por un lado y diferenciación por el otro.

Debe quedar muy claro, que hasta ahora no existe ningún tipo de estudio en *Trypanosoma cruzi* sobre como el parásito metaboliza el hierro necesario a partir del medio y este es un modelo que se propone para tratar de explicar los datos experimentales y continuar el estudio del sistema.

El siguiente paso en este proyecto será tratar de comprender si alguna de las dos hipótesis propuestas se acerca más a la realidad, al explicar de mejor manera la evidencia experimental.

Otro punto será tratar de entender de qué manera se ve afectado el metabolismo celular en presencia del hierro. Qué ocurre cuando la célula lo toma y qué cuando lo expulsa. Para abordar esto se piensa utilizar, por un lado, como marcador metabólico, un fenómeno importante dependiente de hierro y regulador de la obtención de energía de la célula: la respiración; por otro lado se pretende cuantificar la toma de glucosa del medio como otro marcador del metabolismo celular. También queda la pregunta de cómo y porqué la célula varía su capacidad de respuesta dependiendo de su

procedencia y de las condiciones de cultivo. Un primer acercamiento a esta pregunta será a través de la caracterización de las cepas y clona. El tipo de citocromos presente en cada una y su concentración basal interna de hierro. También se tratará de comprender cómo se modifican las pozas internas de hierro al someter a las células a diferentes condiciones de cultivo.

Si las cepas y clona efectivamente demuestran tener concentraciones internas de hierro diferentes, podríamos pensar que esto ocasiona que la entrada de hierro a la célula sea selectiva y que esta utilización de hierro está relacionada con el metabolismo oxidativo de la célula.

Quisiera dejar abiertas una serie de preguntas que se han derivado de este trabajo, sobre las cuales se continuará trabajando: Qué tanto es capaz la célula de responder al incremento del hierro, cuáles son los límites de tolerancia de la célula y si existen concentraciones máximas que sean tóxicas a la célula o que saturen al sistema de tal manera que la célula sea incapaz de seguir respondiendo al estímulo, cómo penetra el hierro a la célula, si el hierro en forma soluble puede llegar a ser captado por la célula y en que forma entra, en estado ferroso o férrico.

Por último, quedan todavía una gran cantidad de preguntas por contestar: de qué manera regula *Trypanosoma cruzi* la entrada de hierro a la célula, cuáles son los mecanismos que utiliza cada estadio celular: **epimastigote**, **tripomastigote** y **amastigote**, para captar hierro del medio, si existen receptores a transferrina en **epimastigotes**, o utiliza un sistema de transporte activo específico para hierro y si existen moléculas de ferritina en este parásito y de qué manera almacena el hierro.

Hasta este momento, sólo se tiene una caracterización de un sistema que evidentemente es de gran complejidad. Sin embargo, las perspectivas del trabajo son muy interesantes: Por un lado

tenemos un modelo que puede dar nueva información sobre el desconocido metabolismo del hierro en *Trypanosoma cruzi*. Por el otro lado, esta misma información sobre cómo y para qué utiliza el parásito el hierro nos pueden dar algún indicio sobre la manera en que éste depende de su hospedero para obtener el hierro esencial, y la manera en que la hipoferremia natural del organismo puede ser un mecanismo seleccionado evolutivamente como defensa contra los microorganismos en determinados ambientes, defensa que hasta ahora no ha sido correctamente reconocida y que puede incluso cambiar el curso de la enfermedad (25), enfermedad que hasta ahora es incurable y mortal

VII CONCLUSIONES

1. Se encontró que el crecimiento del parásito se ve modificado de acuerdo a las concentraciones de fierro del medio de cultivo. El cultivo con doble concentración de **hemina** alcanzó el mayor crecimiento, mientras que la falta de este compuesto disminuyó la proliferación celular.

2. Los cultivos con mayor concentración de fierro, alcanzaron al final de la curva de crecimiento el mayor número de células resistentes a lisis, lo que se interpreta como un aumento en la diferenciación de la forma epimastigote a tripomastigotes y formas en transición.

3. Los cultivos sin **hemina** mostraron un incremento en el número de células resistentes a lisis durante los primeros días de cultivo, decayendo este número posteriormente, en general por abajo del control.

4. La **hematoporfirina** (anillo pirrórico sin el fierro) por si sola, no fue capaz de inducir una respuesta semejante a la observada con la **hemina**. El comportamiento de los cultivos con **hematoporfirina** fue muy parecido al de los cultivos sin **hemina**.

5. El fierro en forma soluble tampoco fue capaz de aumentar de manera importante la proliferación celular ni el número de células resistentes a lisis.

6. La detección de fierro en el sobrenadante mostró que durante los primeros días de cultivo, los cultivos control y con doble **hemina** disminuyeron la concentración del fierro del sobrenadante, siendo el cultivo con doble **hemina** el que mostró la mayor disminución en el fierro del medio. A partir de la mitad de la curva de crecimiento se observa un incremento progresivo en la concentración de fierro en el sobrenadante. Al final de la curva de crecimiento, la mayor

concentración de fierro del sobrenadante correspondió al cultivo con doble **hemina**, siguiéndole en importancia el cultivo control.

7. Los cultivos **sin hemina** y con **hematoporfirina**, aunque también disminuyeron la concentración de fierro del sobrenadante durante el crecimiento y lo aumentaron durante el *plateau*, lo hicieron de manera casi imperceptible.

VIII BIBLIOGRAFIA

- 01, Whittaker, RH, 1969. New Concepts of Kingdoms of Organisms. Science, 163, 150-59
- 02, Whittaker, RH, Margulis, L, 1978. Protist Classification and the Kingdoms of Organisms. BioSystems, 10, 3-18
- 03, Marzo, 1990. Who Features World Health Organization, Reporte No.139. Geneva Switzerland
- 04, Brener, Z, 1973. Biology of *Trypanosoma cruzi*. Ann Rev Microbiol, 27, 347-82
- 05, Nogueira, N, 1986. American Trypanosomiasis: Antigens and Host-Parasite Interactions. En: "Parasite Antigens Toward New Strategies for Vaccines". Ed. Pearson, TW, Decker, M Inc New York and Basel, 91-110
- 06, Herr, A, Brumpt, L, 1939. Primer reporte de la Enfermedad de Chagas en México. Bull.Soc.Path.Exot, 32, 565-71
- 07, Mazzotti, L, 1940. Dos casos de enfermedad de Chagas en el estado de Oaxaca. Gac Med Mex, 70(4), 417-20
- 08, Tellaeche, AM, 1976. Bol Inform, 5, 29-40
- 09, Tay, J, 1980. La enfermedad de Chagas en la República Mexicana. Rev Salud Pub Mex, 22 No4 , 409-50
- 10, Salazar, PM, Tay, J, Ontiveros, A, Jiménez, J, de Haro, I, Bucio, MI, Ruiz, AL, 1983. Enfermedad de Chagas en México. Rev Fac Med Mex, 26, 11-51 3
- 11, Ortega, GM, Beltran, HF, Zavala, VJ 1976. Enfermedad de Chagas en Chiapas. Salud Pub Mex, 18, 837-43
- 12, Tay, J, Salazar, PM, Velasco, M, De Haro, I, Garcia, Y, Gutiérrez, M, 1979. Estudio epidemiológico de la enfermedad de Chagas en el estado de Jalisco, República Mexicana. Salud Pub Mex, 21, 145-49

- 13, Salazar, PM, Tay, J, Ruiz, L, de Haro, I, Buclo, I, Jiménez, J, García, Y, Gutierrez, M, 1984. Seropositividad a *Trypanosoma cruzi* en cuatro grupos de población del estado de Oaxaca. Salud Pub Mex, 26, 589-95
- 14, Hernández-Matheson, IM, Ericsson, CD, Delgadillo, C, Paredes, P, Paredes, M, 1987. New Focus of Chagas' Disease in México. Lancet, 1, Ene 10, 100
- 15, Blagi, FF, Tay, J, Guzmán-García, C, Fong, F, 1964. Tetitlán, Guerrero, foco endémico de Enfermedad de Chagas en México. Rev Fac Med Mex, 6, 625-31
- 16, Dias, E, Perrin, T, Brenes, N, 1947. Notas previas sobre las primeras comprobaciones serológicas de la Enfermedad de Chagas en México. Arch Inst Cardiol Mex, 17, 20-24
- 17, Salazar, PM, de Haro, I, Uribarren, T, 1988. Chagas Disease in Mexico. Parasitol Today, 4 No12, 348-352
- 18, Cortéz, JM, Velasco Castrejón, O, Labastida, MH, Melchor, AH, Duarte, N, de Torre, R, 1985. La enfermedad de Chagas en Santiago Yosotiche, Oaxaca, México Salud Pub Mex, 27, 60-5
- 19, Zavala, CJE, 1987. Cardiopatía Chagásica detectada en pacientes del Hospital "A" General Regional O'Horan. Tesis, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Yucatán
- 20, Schofield, CJ, 1985. Control of Chagas' Disease Vectors. Br Med Bull, 41, 187-94
- 21, Aisen, P, Listowsky, I, 1980. Iron Transport and Storage Proteins. Ann Rev Biochem, 49, 357-93
- 22, Spiro, TG, Saltman, P, 1974. Inorganic Chemistry. En: "Iron in Biochemistry and Medicine" Ed Jacobs, A, Worwood, M. Academic Press, 1-28
- 23, Nellands, J, 1981 Microbial Iron Compounds. Ann Rev Biochem, 50, 715-31
- 24, Banyard, SH, Stammers, K, Harrison, PM, 1978. Electron Density Map of 50 Apoferritin at 2.8Å resolution. Nature, 271, 282-84
- 25, Weinberg, ED, 1984. Iron withholding: A defense against infection and neoplasia. Physiol Rev, 64 No1, 65-102
- 26, Weinberg, ED, 1978. Iron and Infection. Microbiol Rev, 42 No 1, 45-66.

- 27, Beisel, WR, 1976. Trace elements in infectious processes. *Med Clin North Am*, 60, 831-849
- 28, Murray, MJ, Murray, AB, Murray, MB, Murray, CJ, 1978. The adverse effect of Iron repletion on the course of certain infections. *Br Med J*, 2, 1113-1115
- 29, Lalonde, RG, Holbein, BE, 1984. Role of Iron in *Trypanosoma cruzi* Infection of Mice. *J Clin Invest*, 73, 470-476
- 30, Loo, VG, Lalonde, RG, 1984. Role of Iron on the Intracellular Growth of *Trypanosoma cruzi*. *Infect Immun*, 45, 726-730
- 31, Lima, MF, Villalta, F, 1990. *Trypanosoma cruzi* receptor for human transferrin and their role. *MBP*, 38, 245-252
- 32, Barnes, R, Connely, JL, Jones, OT, 1972. The utilization of iron and its complexes by mammalian mitochondria. *Biochem J*, 128, 1043-1055
- 33, Lehninger, A, 1985. Catabolismo y Producción de la energía de enlace. En : "Bioquímica", 2da Edición. Omega, 453-599
- 34, Luckner, M, 1989. Porphyrin-Derived Secondary Products. En: "Secondary Metabolism in Microorganisms, Plants and Animals", 3rd Edition. Springer Verlag, 417-19
- 35, Camargo, EP, Chlari, E, 1983. Culturing and cloning of *Trypanosoma cruzi*. En: "Genes and Antigens of Parasites" 2da Edición. Ed Morel, CM UNDP/WORLD BANK/WHO, 23-26
- 36, Noguelra, N, Blanco, C, Cohn, Z, 1975. Studies on the selective Lysis and Purification of *Trypanosoma cruzi*. *J Exp Med*, 142, 224-229
- 37, Galván, SC, Rublo, J, Sánchez, R, Ortega, J, Castañeda, M, 1983. Phenetic Variation in *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi* isolates. *Comp Biochem Physiol*, 74B No.3, 573-78
- 38, Postan, M, Dvorak, JA, McDaniel, JP, 1983. Studies of *Trypanosoma cruzi* clones in inbred mice. *Am J Trop Med Hyg*, 32 No.3, 497-506
- 39, Joiner, K, Sher, A, Gaither, T, Hammer, C, 1986. Evasion of the alternative complement pathway by *Trypanosoma cruzi* results from inefficient binding of factor B. *PNAS*, 83, 6593-6597

- 40, Jolner, K, Dias daSilva 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 No23, 11327-11335
- 41, Schaub, GA, Losch, P, 1988 *Trypanosoma cruzi*: Origin of metacyclic trypomastigotes in the urine of the vector *Triatoma infestans*. Exp Parasitol, 65, 174-186
- 42, Marinkelle, CJ, Vallejo, GA, Guhl, F, De Sánchez, N, 1985. Diferenciación entre *Trypanosoma cruzi* y *Trypanosoma rangeli* en el intestino del vector *Rhodnius prolixus*, en base al comportamiento de estos flagelados frente a la actividad lítica del complemento. Rev Lat-amer Microbiol, 27, 21-25
- 43, Dvorak, JA, Engel, JC, Leapman, RD, Swyt, CR, Pella, PA, 1988. *Trypanosoma cruzi*: elemental composition heterogeneity of cloned stocks. MBP, 31, 19-26
- 44, Sturrock, A, Alexander, J, Lamb, J, Craven, CM, Kaplan, J, 1990. Characterization of a transferrin-independent uptake system for iron in HeLa cells. J Biol Chem, 265 No6, 3139-3145
- 45, Kaplan, J, Jordan, I, Sturrock, A, 1991 Regulation of the transferrin-independent iron transport system in cultured cells. J Biol Chem, 266 No5, 2997-3004
- 46, Weinberg, ED, 1990. Roles of trace metals in transcriptional control of microbial secondary metabolism. Bio Met, 2, 191-196
- 47, Gerisch, G, 1987. Cyclic AMP and other signals controlling cell development and differentiation in *Dictyostelium*. Ann Rev Biochem, 56, 853-879,

**ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

IX APENDICE

- 1. PREPARACION DE MEDIO LIT**
- 2. MANTENIMIENTO DE LOS CULTIVOS**
- 3. PREPARACION DE HEMATOPORFIRINA**
- 4. PREPARACION DE FIERRO SOLUBLE**
- 5. CONTEO EN CAMARA DE NEUBAUER**
- 6. TINCION CON GIEMSA**
- 7. OBTENCION DE SUERO PARA LISIS**
- 8. ENSAYO DE LISIS**

1. PREPARACION DE MEDIO LIT (Liver Infusion Tryptose)

Cloruro de sodio (NaCl)	4.0 g
Cloruro de potasio (KCl)	0.4 g
Fosfato disódico (Na ₂ HPO ₄)	8.0 g
Glucosa (Dextrosa)	2.0 g
Triptosa	5.0 g
Infusión de hígado	5.0 g
Hemina(*)	25.0 mg
Suero (**)	1000.0 ml
Agua bidestilada q.s.p.	1000.0 ml

(*) La hemina puede disolverse en trietanolamina (TEA) o en hidróxido de sodio, preparándose soluciones stock de 50 mg/ml. La hemina preparada se esteriliza por filtración con filtros Millipore de 0.4 μ M. Se puede utilizar lisados de hemoglobina (HL) en lugar de la hemina.

(**) Se puede utilizar suero de buey, becerro o fetal bovino inactivado a 60°C por 50 minutos.

Para el cultivo del parásito en el laboratorio se utiliza hemina disuelta en TEA (al 50% en agua bidestilada) y suero fetal bovino (Gibco).

1.1 PREPARACION DEL LIT

Se disuelven los componentes del medio en agua, exceptuando el suero y la hemina. El pH se ajusta a 7.2 con HCl concentrado. El medio se esteriliza por filtración en filtros Millipore ó en autoclave durante 20 minutos a 15 libras. Una vez fríto, se le agrega la hemina y el suero en condiciones de esterilidad. El medio se guarda a -4°C .

2. MANTENIMIENTO DE LOS CULTIVOS

Los cultivos de *Trypanosoma cruzi* se mantienen de 26 a 28°C . Los epimastigotes de fase media logarítmica o de inicio del plateau son utilizados para sembrar nuevos cultivos. La concentración inicial del cultivo debe estar entre 2 a 5×10^6 células/ml. El tiempo promedio de generación es de aproximadamente 24 horas. En una semana los cultivos pueden alcanzar una concentración de 5 a 10×10^7 células/ml, según las condiciones de aereación. Las cepas se mantienen por subcultivos semanales. El subcultivo semanal se efectúa con 1 ml del cultivo viejo que se pone en 4 ml de LIT nuevo en Frascos Falcon de 25 cm^2 .

3. PREPARACION DE HEMATOPORFIRINA

Se prepara una solución stock 2x a la misma molaridad a la que se utiliza la hemina.

Hemina p.m. 651.9 g

HPR p.m. 598.68 g

LIT 25 mg/1l

651.9g - 1M - 1l

598.68g - 1M - 1l

0.025g- 3.83×10^{-5} M0.022g- 3.98×10^{-5} -1l

La solución se preparó diluyendo 44 mg de hematoporfirina en 1 ml de TEA de manera que para cada litro de LIT SH se le agrega 500 μ l del stock.

4. PREPARACION DEL FIERRO SOLUBLE

Se preparó una solución stock 1x de sulfato de amonio férrico a la misma concentración que se utiliza la hemina.

Hemina p.m. 651.9 g

 $\text{NH}_4\text{Fe}(\text{SO}_4)_2$ p.m. 266.01g

LIT 25 mg/1l

651.9g - 1M - 1l

266.01g - 1M - 1l

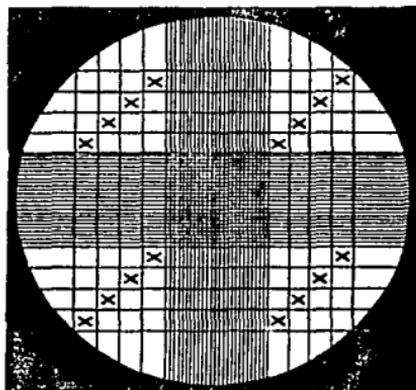
0.025g- 3.83×10^{-5} M-1l0.010g- 3.83×10^{-5} -1l

La solución se preparó con 10 mg de SAF diluidos en 1 ml de agua desionizada de manera que para cada litro de LIT SH se le agrega 1 ml del stock.

5. CONTEO EN CAMARA DE NEUBAUER

El número de células se determina por conteo en hemocitómetro o cámara de Neubauer ó utilizando contadores electrónicos de células. Las muestras se diluyen en formaldehído al 10% en un amortiguador de fosfatos salino (PBS).

La cámara se carga con una alícuota y se cuenta el número total de organismos en 16 cuadros en diagonal (ver figura): 16 cuadros = 0.1 mm^3 . El número total por ml = Número contado x 10 (número en 1 mm^3) x 10^3 (número en 1 ml) x factor de dilución (10 ó 100 ya sea 1:10 ó 1:100 la dilución realizada).



PREPARACION DE PBS

1. Na_2HPO_4 9.47 g / 1l
2. NaH_2PO_4 4 9.08 g / 1l
3. NaCl 0.876 g / 100 ml

Mezclar 1 y 3 y ajustar el pH a 7.2 con 2.

6. TINCION CON GIEMSA

De una preparación fresca de tripanosomas se toman 10 μ l del cultivo:

1. Expandir la gota de cultivo en un portaobjetos limpio
2. Dejar secar al aire.
3. Fijar en metanol absoluto a sequedad.
4. Teñir con la solución de Giemsa durante 5 minutos.
5. Lavar con agua destilada.
6. Dejar secar a temperatura ambiente.

Evaluar en microscopio óptico a 40x:

1. Morfologías (identificación de estadios celulares).
2. Evidencia de proliferación.
3. Tamaño de las células.

PREPARACION DE LA SOLUCION DE GIEMSA

Diluir al 0.2 % (aprox. 3 gotas por ml) la solución de Giemsa comercial en PBS pH 7.2

7. OBTENCION DE SUERO PARA LISIS

A partir de sangre fresca (ratón, rata, vaca, humano) y sin utilizar anticoagulantes:

1. Centrifugar a 20 minutos a 2,000 g's.
- 2 Tomar el sobrenadante.
3. Centrifugar por 20 minutos a 3,000 g's.
4. Filtrar en Millipore poro de 0.45 μ m.
5. Guardar en alícuotas de 100 μ l. Utilizar fresco o almacenar a -20°C y descongelar previo a su uso.

Las alícuotas se descartan una vez que se abren.

8. ENSAYO DE LISIS ,

(Modificado de Nogueira *et al.* 1975)

A partir de una alícuota del cultivo de por lo menos 50 μ l:

1. Agregar a la alícuota 50% (v/v) de suero activo (SA).
2. Incubar a 28°C durante toda la noche.
3. Contar supervivientes en cámara de Neubauer.
4. Determinar viabilidad en microscopio de contraste de fases.
5. Calcular el porcentaje de células supervivientes al SA y tomar como 100% la cuenta inicial de organismos.
6. Preparar laminillas teñidas con Giemsa.