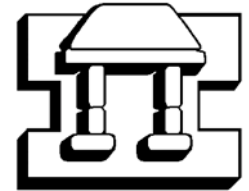


UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTONOMA DE MEXICO



IZTACALA

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
IZTACALA

CARRERA DE BIOLOGÍA

**“Uso de Proteínas Fluorescentes para
estudiar el proceso de Infección
de *Trypanosoma cruzi*”**

T E S I S

PARA OBTENER EL TITULO DE:

B I O L O G O

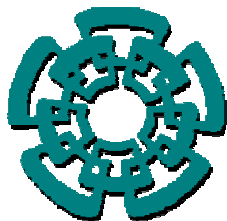
P R E S E N T A :

LUIS ENRIQUE FLORENCIO MARTINEZ

Directora de tesis:

DRA. REBECA G. MANNING CELA

CENTRO DE INVESTIGACION Y ESTUDIOS AVANZADOS
DEL IPN
DEPARTAMENTO DE BIOMEDICINA MOLECULAR



Tlalnepanitla, Estado de México

2004



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Agradecimientos.

A la Universidad Nacional Autónoma de México, por darme la gran oportunidad de pertenecer a esta máxima casa de estudios. Gracias por permitirme ser universitario.

A la Facultad de Estudios Superiores Iztacala, muy en especial a los profesores de la carrera de Biología, por ser magníficos maestros en la formación que me han dado, logrando en mí ser un gran profesional.

Al Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, en especial al Departamento de Biomedicina Molecular por todo el apoyo otorgado para realizar satisfactoriamente ésta tesis.

A mi directora de tesis Dra. Rebeca G. Manning Cela por darme la oportunidad de pertenecer a su grupo de trabajo, por creer y confiar en mí, por compartir conmigo parte de sus conocimientos, por su tiempo dedicado, por compartir éste proyecto, por impulsar más en mí este amor a la ciencia, por contagiarme de su entusiasmo. Pero sobre todo por su Amistad la cual y aunado a todo lo que gira en torno al laboratorio ha hecho la estancia más maravillosa y fascinante que he tenido. GRACIAS DOCTORA!!

A la Q.F.B. Claudia Márquez por todo el apoyo técnico otorgado para realizar éste proyecto, por todos sus consejos y por su disponibilidad de tiempo. Muy en especial por su Amistad. Gracias "Claus"!!

A la M en C. Gloria Luz Paniagua Contreras, al Dr. Erasmo Negrete Abascal, al M en C. Eric Monroy Pérez y al Biól. José Luis Tello Musi, por su tiempo otorgado para la revisión de éste proyecto, pero sobre todo por ser Profesores excepcionales durante mi formación, así como por su amistad brindada. Mil Gracias!!

Al técnico Sr. Pedro, por su apoyo, por la disponibilidad de material y por su amistad.

A todos de una forma infinita les doy las GRACIAS, sin ustedes éste proyecto que concluyo no hubiera sido el mismo.

Dedicatorias

Antes que nada quiero decirles que éste trabajo tiene mucho de mí, noches en vela; días de desvelo, muchos días de alegría; otros de tristeza, días de exceso; otros de carencia, fracasos obtenidos; victorias levantadas, sueños compartidos, realidades contempladas en fin. Todo lo que me pudo haber pasado en los últimos años, pero también tiene algo de ustedes los que ríen, los que sienten, los que quieren y que constantemente cambian mi vida y me mantienen vivo, siempre al frente. Este trabajo es para todos ustedes con todo mi corazón.

A mi Mamá Mónica Martínez Maturano por regalarme lo más hermoso del mundo, la vida, pero sobre todo por permitirme ser tu hijo. Éste logro es para ti, espero con ello compensar una pequeñísima parte de tus desvelos, tristezas, enojos y angustias pasadas. De igual forma espero corresponder a tus ilusiones hechas cuando decidiste ser mi madre. TE QUIERO MUCHO!!

A mis hermanos Rosalba, Guadalupe, Horacio, Benito, Hilda, César, Karina, Aarón, Oscar y René. Gracias por ser mis hermanos, por el apoyo que me han dado, por que en su momento han creído en mí. LOS QUIERO!!

A mis cuñadas, especialmente a Martha y a Juana, gracias por creer en mí y darme siempre su apoyo.

A mis sobrinos Laura, Yayo, Lucy, Lupita, Miriam, Amauri, Chuchito, Sofía, Beto, Aarón, Edgar Iván, Pao y Jesús. Éste trabajo es para ustedes esperando los pueda servir de ejemplo y los motive a seguir adelante. LOS QUIERO MUCHO!!

A la señora Emelia Alvizo Martínez. Las mamás no siempre son biológicas. Gracias por darme toda su confianza y cariño, por quererme como un hijo y siempre motivarme a salir adelante, gracias por estar ahí cuando más necesitaba esas palabras de aliento. Éste es un pequeño fruto de lo que sembró en mí, ojalá sea una satisfacción y orgullo para usted, con muchísimo cariño LA QUIERO MUCHO!!

Para una personita muy especial que mueve mi mundo y lo pone a caminar. De una forma muy especial para mi Bebe: Idania Cruz Sauza, porque has sido uno de los motores más importantes en esta etapa de mi vida. Gracias por compartir conmigo estos momentos inolvidables, por estar siempre a mi lado compartiendo juntos un sueño, pero sobre todo por

todos los días felices y esas alegrías pasadas, por todos esos grandes momentos corazón. Aquí concluyo una etapa de mi vida, pero empiezo una más importante, con la ilusión de que estés siempre a mi lado para seguir compartiendo esos grandes momentos. Gracias por todo tu amor, cariño, comprensión, ternura pero sobre todo por tu amistad. Con todo mi amor, TE QUIERO BEBE!!

Al señor Armando Villanueva Anguiano así como a su esposa la señora Guadalupe e hijos: Rene, Oscar y Katy. De igual forma al señor Roberto Galicia E., Por ser personas muy importantes al iniciar esta etapa de mi vida, gracias por darme esta gran oportunidad, por motivarme siempre a seguir adelante, por todos sus consejos, por su tiempo, su dedicación, su respaldo y apoyo incondicional, gracias por su amistad y el cariño brindado, sin ustedes tal vez esto no hubiera sido posible.

Con todo mi corazón a toda la familia Alvizo Martínez: Ramón, Paty, sra. Concha, sra. Emelia y demás hermanas, así como a todos sus hijos, especialmente a Martín, Jorge, Lalo, Hector. Por permitirme ser parte de esta maravillosa familia que estimo mucho, GRACIAS!!

A Juan y su esposa "Guera", por estar conmigo, por siempre darme sus palabras de aliento y motivarme a seguir siempre adelante y cumplir mis metas. Este proyecto es para ustedes, resultado de todos sus consejos y palabras que me motivaron a cumplir con mis objetivos. Gracias, espero se sientan satisfechos de lo que en mi han logrado.

Para mis amigos de toda la vida Carlos Cesar Alonso, Carlos Pérez, Martín, Cesar, Arturo, Ernesto, Teresa, Selene Noe, Miguel. Con todos ustedes compartí gran parte de mi vida, vivimos miles de cosas juntos, pasamos buenos momentos, compartimos muchísimas alegrías, algunas tristezas y decepciones, reímos, lloramos, gritamos y aunque hemos tomado caminos diferentes, la vida aún nos mantiene unidos. Permítanme compartir con ustedes este momento, por todas sus motivaciones, consejos, por su amistad, por estar siempre ahí, pero sobre todo por ser mis amigos. Con todo mi corazón LOS QUIERO!!

A Meche, Gaby, otra Gaby, Karina, Claudia, Oswaldo, Jacqueline, Luis Enrique Sánchez (pili), Anselmo, por siempre apoyarme y compartir una parte de mi vida juntos.

De una forma muy especial para mis amigas de Iztacala, Liliana, Ruth, Ale, Hilda, por compartir conmigo estos años que duro mi estancia en Iztacala, por brindarme su amistad, por ser como son y estar conmigo en los buenos y malos momentos, por apoyarme siempre en mis proyectos, MIL GRACIAS, las quiero mucho.

Con todo mi amor para Idania, porque más que pareja has sido una gran amiga.

A Lorena, por ser una lindisima persona, por su amistad y todo su apoyo como amiga, por estar conmigo Gracias Lore!!

A Elvia por compartir conmigo su amistad, por escucharme, por todas las alegrías vividas.

Para Palomita Blanca piquito dorado, a Luis Cárdenas y Zoris, por todos los buenos momentos que hemos pasado, los quiero mucho. Gracias por su amistad es incomparable.

Con cariño para mi colega y amiga de toda la vida Teresa Margarita eres muy especial, gracias por apoyarme incondicionalmente y estar siempre conmigo en los momentos más difíciles. TE QUIERO MUCHO!!

A Esmeralda y Dolores por su amistad que me han dado.

Para todos mis amigos de Iztacala Lalo, José Natividad, Julio Cesar, Chago, Julio, Iván Villegas, Saúl Salomón, Víctor, Pedro, Israel, Damián, Luis Enrique, Larry, Pedro "loco" donde estés, Chucho, Gustavo "Pancho", Ricardo, Cesar, con todos y cada uno de ustedes pase momentos inolvidables, gracias por todo su apoyo y cariño.

A mis amigos del labo:

A la Dra. Rebeca G. Manning. Gracias por su amistad y sus sabios consejos.

Para Edith porque has sido una magnifica amiga y compañera, gracias por tu amistad, por tu cariño, por escucharme, pero sobre todo por el apoyo que me has dado y el estar conmigo, TE QUIERO MUCHO!!

A Julio García Cordero, Colega muchas gracias por tu amistad, por tus palabras en esos momentos, por todo tu apoyo y el afecto que me tienes, gracias por creer en mí y darme tu plena confianza. Eres una persona sin igual. **TE QUIERO MUCHO!!**

A David Esau, por compartir esos buenos momentos, por esos martes, por tu amistad, **MIL GRACIAS!!**

A la Dra. Janeth, por toda su ayuda, por tus sugerencias y comentarios pero aún más por su amistad. Gracias Jane!!

Por supuesto al Dr Gilberto Ballesteros, por todo su apoyo para concluir esta tesis. Gracias Gilson, por todos tus comentarios, sugerencias, tu tiempo. Pero sobre todo por tu amistad, por soportarme, por algunas ocasiones escucharme, por estar conmigo, por ser como eres, por esto y mil cosas más gracias Gil. **TE QUIERO MUCHO!!**

A Chuchito, por su amistad, por ser como es, incomparable. A Julio Cabrera, por darme la oportunidad de convivir contigo. A Luis "conejito" por compartir su amistad conmigo. Para Horacio y Januzs por ser más que los vecinos, gracias por su amistad.

A todos y cada uno de ustedes, a los que no están, los que se han ido o por alguna extraña razón de la vida se han perdido, a los que en algún momento se encontraron en mi camino y hoy no los pude recordar, a los que cambiaron por un instante mi vida y llevo en mi corazón. A todos ustedes hoy les quiero decir gracias, por apoyarme, por estar conmigo, por ser como son, por intentar cambiarme para ser siempre mejor. Además les quiero decir que las familias no necesariamente son biológicas y que con todos y cada uno de ustedes siempre me siento como en casa, les quiero decir también que entre todos ustedes no tengo un favorito, porque todos ustedes son mis favoritos, con estas palabras les quiero decir que todos ustedes han sido mi familia en el transcurso de mi vida y que este trabajo producto de la dedicación y esfuerzo es para todos ustedes. Con todo mi corazón, **LOS QUIERO MUCHO!!**

Luis Enrique Florencio Martínez

Otño 2004

Índice

		Página
	Resumen.....	1
1	Introducción.....	2
1.1	Antecedentes Generales.....	2
1.1.1	La Enfermedad de Chagas.....	3
1.1.2	Clasificación.....	3
1.1.3	Morfología y Características Estructurales.....	5
1.1.4	Ciclo de Vida.....	7
1.1.5	Distribución.....	11
1.1.5.1	Ecología.....	12
1.1.5.2	Huéspedes Reservorios.....	12
1.1.6	Epidemiología.....	13
1.1.7	Forma de Transmisión.....	14
1.1.7.1	Vectores.....	15
1.1.8	Interacción Huésped-Parásito.....	17
1.1.9	Patología.....	17
1.1.9.1	Fase aguda.....	18
1.1.9.2	Fase Indeterminada.....	18
1.1.9.3	Fase Crónica.....	18
1.1.9.4	Inmunología.....	19
1.1.9.5	Diagnostico.....	19
1.1.10	Prevención y Control.....	20
1.1.11	Tratamiento.....	21
1.1.12	Proceso de Infección.....	22
1.1.13	Moléculas del Parásito Involucradas en el Proceso de Infección.....	24
1.1.14	Proceso de Unión del Parásito a la Célula Huésped.....	25
1.1.15	Proceso de invasión de los diferentes estadios de desarrollo del parásito.....	27
1.2	Genes Reporteros.....	32
1.2.1	Proteína Verde Fluorescente EGFP.....	33
1.2.2	Proteína Roja Fluorescente DsRed.....	35
1.3	La Línea Celular.....	36
1.3.1	Fibroblastos 3T3 NIH.....	36
2	Justificación.....	39
3	Objetivos.....	40
3.1	Objetivos Particulares.....	40
4	Material y Métodos.....	41
4.1	Material Biológico.....	41
4.1.1	Células Huésped.....	41
4.1.1.1	Cultivo de Fibroblastos 3T3 NIH.....	41
4.1.2	Parásitos.....	41
4.1.2.1	Obtención de clona de parásitos.....	42
4.1.2.2	Cultivo de parásitos.....	42
4.1.2.3	Curvas de crecimiento.....	43
4.2	Expresión de la Proteína EGFP y DsRed en Epimastigotes Transfectados con los Plásmidos pTREXn EGFP y pTREXn DsRed Cultivados a Diferentes pH.....	43
4.3	Transformación <i>in vitro</i> de epimastigotes de <i>T. cruzi</i>	44
4.3.1	Medio.....	44
4.4	Infección de fibroblastos 3T3 NIH con <i>Trypanosoma cruzi</i>	46
4.4.1	Infección primaria.....	46

4.5	Purificación de tripomastigotes y amastigotes.....	46
4.6	Infección secundaria con diferentes estadios de <i>T. cruzi</i> (epimastigotes, tripomastigotes y amastigotes).....	47
4.7	Montaje de laminillas.....	47
5	Resultados.....	49
6	Discusión.....	75
7	Conclusión.....	82
8	Referencias.....	83

Índice de figuras

		Página
Fig. 1	<i>Trypanosoma cruzi</i> , estadio de tripomastigote.....	4
Fig. 2	Estadios de <i>T. cruzi</i>	7
Fig. 3	Ciclo de vida de <i>T. cruzi</i>	9
Fig. 4	Subciclo de vida alternativo.....	10
Fig. 5	Distribución de <i>T. cruzi</i>	11
Fig. 6	Distribución de los vectores de <i>T. cruzi</i>	15
Fig. 7	Insecto hematófago.....	17
Fig. 8	Signo de Romaña.....	19
Fig. 9	Células de tejido conectivo.....	37
Fig. 10	Fibroblastos 3T3 NIH.....	38
Fig. 11	Población de epimastigotes transfectados con la secuencia que codifica para EGFP... ..	49
Fig. 12	Población de epimastigotes transfectados con la secuencia que codifica para DsRed1-1.....	49
Fig. 13	Clonas de epimastigotes EGFP.....	50
Fig. 14	Clonas de epimastigotes DsRed.....	50
Fig. 15	Curva de crecimiento de epimastigotes WT, EGFP y DsRed.....	51
Fig. 16	Tolerancia a distintos pH.....	51
Fig. 17	Transformación in vitro de epimastigotes WT, EGFP y DsRed en medio DMEM fresco complementado al 2% SFB + cultivo celular.....	54
Fig. 18	Transformación in vitro de epimastigotes WT, EGFP y DsRed en medio DMEM fresco complementado al 2%SFB.....	55
Fig. 19	Transformación in vitro de epimastigotes WT, EGFP y DsRed en medio DMEM condicionado 48 horas.....	56
Fig. 20	Transformación in vitro de epimastigotes WT, EGFP y DsRed en medio DMEM condicionado 96 horas.....	58
Fig. 21	Cinética de infección primaria en fibroblastos 3T3 NIH.....	58
Fig. 22	Cinética de infección primaria fibroblastos con epimastigotes EGFP.....	59
Fig. 23	Cinética de infección primaria fibroblastos con epimastigotes DsRed.....	59
Fig. 24	Cinética de infección secundaria en fibroblastos 3T3 NIH infectados con 2×10^6	61
Fig. 25	Cinética de infección secundaria en fibroblastos 3T3 NIH infectados con 1×10^5	61
Fig. 26	Cinética de infección secundaria en fibroblastos 3T3 NIH infectados con 1×10^5	62
Fig. 27	Cinética de infección secundaria en fibroblastos 3T3 NIH infectados con 1×10^5	62
Fig. 28	Cinética de infección secundaria en fibroblastos 3T3 NIH infectados con 2×10^6	63
Fig. 29	Cinética de infección secundaria en fibroblastos 3T3 NIH infectados con 1×10^5	64
Fig. 30	Número de parásitos por célula en fibroblastos 3T3 NIH infectados con 1×10^5	65
Fig. 31	Número de parásitos por célula en fibroblastos 3T3 NIH infectados con 2×10^6	66
Fig. 32	Número de parásitos por célula en fibroblastos 3T3 NIH infectados con 1×10^5	66
Fig. 33	Número de parásitos liberados al sobrenadante.....	67
Fig. 34	Cinética de infección. Fibroblastos 3T3 NIH infectados con 1×10^5 / ml tripomastigotes expresando la proteína EGFP.....	68
Fig. 35	Cinética de infección. Fibroblastos 3T3 NIH infectados con 1×10^5 / ml	69

	epimastigotes expresando la proteína EGFP.....	
Fig. 36	Cinética de infección. Fibroblastos 3T3 NIH infectados con 1×10^5 / ml amastigotes expresando la proteína EGFP.....	70
Fig. 37	Cinética de infección. Fibroblastos 3T3 NIH infectados con 1×10^7 / ml tripomastigotes expresando la proteína DsRed.	71
Fig. 38	Cinética de infección. Fibroblastos 3T3 NIH infectados con 1×10^5 / ml epimastigotes expresando la proteína DsRed.....	72
Fig. 39	Cinética de infección. Fibroblastos 3T3 NIH infectados con 1×10^5 / ml amastigotes expresando la proteína DsRed.....	73
Fig. 40	Epimastigotes de <i>T. cruzi</i> infectando fibroblastos 3T3 NIH.....	74

Índice de tablas

Página

Tabla 1	Curva de crecimiento de epimastigotes WT, EGFP y DsRed.....	50
----------------	---	----

Lista de abreviaturas

%	Por ciento
α	Alfa
β	Beta
<i>A. victoria</i>	<i>Aequoria victoria</i>
ADN	Ácido desoxirribunucleico
AE	Amastigotes extracelulares
ama	Amastigotes
AMPc	Adenosin mono fosfato ciclico
ARN	Ácido ribonucleico
b-gal	b-galactosidasa
BSA	Albúmina serica bobina
C	Célula
Ca ⁺	Calcio
CB	Citocalacina B
CD	Citocalacina D
CHO	Células de ovario de hámster chino
CMV	Citomegalovirus
CO ₂	Bióxido de carbono
DMEM	Dulbecco's modified Eagle Médium
DsRed	Proteína roja fluorescente
EDTA	Ácido etilenodiaminotetraacético
EGFP	Proteína verde fluorescente aumentada
epi	Epimastigotes
FACS	Separación de células activadas por fluorescencia
fl	Flagelo
G418	Geneticina 418
GFP	Proteína verde fluorescente

gp	Glicoproteína
gr	Gramo
HCL	Ácido clorhídrico
HUVECS	Células endoteliales de vena umbilical
IgG	Inmunoglobulina G
IgM	Inmunoglobulina M
IP3	Inositol Trifosfato
K	Cinetoplasto
kDa	Kilo Daltones
kg	Kilogramo
LIT	Liver infusión triptose
lt	litro
M	Molar
mg	Miligramos
ml	Mililitros
N	Normal
NaOH	Hidróxido de sodio
NCAM	Moléculas de adhesión en células neurales
nm	nanometros
Nu	Núcleo
°C	Grados centígrados
P	Parásito
pb	Pares de base
PBS	Buffer salino de fosfatos
PE	Parásito extracelular
pH	Potencial de Hidrogeno
PI	Parásito intracelular
PP	Parásito penetrando
rpm	Revoluciones por minuto
RT-PCR	Reacción de transcriptasa reversa y reacción en cadena de la polimerasa
SDS	Duodecil sulfato de sodio
SFB	Suero fetal bobino
SFC	Suero fetal de ternera
<i>T. brucei</i>	<i>Trypanosoma brucei</i>
<i>T. cruzi</i>	<i>Trypanosoma cruzi</i>
<i>T. rangeli</i>	<i>Trypanosoma rangeli</i>
tri	Tripomastigotes
TS	Trans-sialidasas
Um	Membrana ondulante
WT	<i>Wild type</i>
µl	Microlitros
µm	Micrometros

Resumen

Trypanosoma cruzi es un parásito protozoario de importancia médica y biológica causante de la enfermedad de Chagas. El proceso de infección de la célula huésped por *T. cruzi* es un proceso complejo que involucra diversas etapas. Evidencias experimentales han sugerido que los tripomastigotes y amastigotes infectan a la célula huésped con diferente eficiencia. El avance en este campo de investigación se ha visto limitado por las dificultades que representa el poder visualizar los parásitos durante el desarrollo de la infección permanecido aún varias preguntas por contestar y dilucidar aquellas que aún se encuentran en debate. En este trabajo utilizamos parásitos *knock-in* verdes y rojos fluorescentes para estudiar *in vivo* el proceso de infección de fibroblastos 3T3 NIH. Los resultados obtenidos muestran que los tres estadios son infectivos. Como primer paso obtuvimos clonas de epimastigotes transfectados con ADN del plásmido pTREXn EGFP y pTREXn DsRed1-1 resistentes al antibiótico de selección, con estos parásitos se realizaron infecciones primarias que nos permitieron obtener tripomastigotes y amastigotes que expresaban las proteínas fluorescentes EGFP y DsRed. Con estos estadios realizamos cinéticas de infección en fibroblastos 3T3 NIH. Los resultados obtenidos nos mostraron que los amastigotes iniciaron su replicación en las primeras 4 horas de haberse internado en la célula huésped mientras que los tripomastigotes y epimastigotes lo hicieron 24 y 48-72 horas después respectivamente. En todos los casos se observaron células completamente infectadas y la liberación de parásitos al sobrenadante se dio a las 168 horas para infecciones iniciadas con tripomastigotes y amastigotes y 48 horas después para epimastigotes. A tiempos posteriores las cinéticas de infección fueron iguales en los tres estadios. Estos resultados sugieren que los tripomastigotes, amastigotes y epimastigotes presentan posibles mecanismos de unión y/o invasión distintos.

1) Introducción

Trypanosoma cruzi es miembro de la familia Trypanosomatidae del orden Kinetoplastida, en donde además se agrupan otros parásitos patógenos de mamíferos como *Trypanosoma brucei* y *Leishmania*, estos son parásitos ubicuos que se encuentran en todas las clases de vertebrados y son transmitidos por artrópodos hematófagos. Estas tres especies juntas son responsables de enfermedades que afectan a más de 200 millones de personas de manera directa y a un número aún mayor a través del impacto económico que éstos y otros parásitos relacionados producen (Sánchez-Hernández B.E 1996; Velasco O.1991). *Trypanosoma cruzi* es un protozooario flagelado, catalogado como parásito intracelular obligado que afecta a una gran cantidad de células nucleadas. Este parásito es de gran importancia médica y biológica siendo el agente etiológico de la enfermedad de Chagas o tripanosomiasis americana. Esta enfermedad afecta a más de 20 millones de personas que habitan zonas cálidas y húmedas en el Sur y Centro de América, tanto de manera directa como indirecta al afectar a animales de importancia económica (Tay, 1994; Esquerdo G. F., 1993). En México se han confirmado más de 400 casos agudos de infección por *T. cruzi*, esto en los 23 estados situados al sur del Trópico de Cáncer. Sin embargo, el número de infectados podría ser mucho mayor, pues estudios seroepidemiológicos han mostrado que existe cerca de un 1.6 % de casos seropositivos en todo el país siendo mayor la prevalencia en la región central de la Huasteca, que es una área tropical (Guzmán-Bracho C., 2001).

1.1 Antecedentes Generales

Las parasitosis son un grave problema en América Latina, de ellas la enfermedad de Chagas o tripanosomiasis americana ocupa uno de los primeros lugares en cuanto al número de casos notificados. En México, los dos primeros casos procedentes del estado de Oaxaca, fueron descubiertos por Mazzoti en 1940, aunque anteriormente fray Bernardino de Sahagún ya hacía referencia del vector indicando la existencia de “unas cucarachillas pardiñas que son ponzoñosas y donde pican imprimen comezón e hinchazón”. En la

actualidad se ha confirmado que su presencia se relaciona estrechamente con las condiciones de pobreza que afectan a gran parte de la población rural de América Latina. Las deficientes condiciones de vivienda mantienen las endemias chagásicas. Se considera que en México las áreas con más probabilidad endémica son las que se ubican a menos de 1800 m sobre el nivel del mar, dado que en esta región altitudinal, en zonas rurales se han encontrado altos índices de infección por triatomíneos (Ojeda-luna M., Murguía-Martínez P., 1998).

1.1.1 La Enfermedad de Chagas

La enfermedad de Chagas es una zoonosis causada por *T. cruzi*. Fue descubierta en Minas Gerais, Brasil. Recibe su nombre en honor del Dr. Carlos Chagas, médico brasileño que describió la enfermedad por primera vez en 1909 e identificó al tripanosoma. El Dr. Chagas también discernió el ciclo de vida del parásito y los insectos que lo transmiten, así como el grupo de pequeños mamíferos que actúan como reservorio en la naturaleza (Cevallos *et al.*, 2002; WHO 1996).

1.1.2 Clasificación

El Phylum Sarcomastigophora comprende todos los protozoarios que poseen flagelos y pseudópodos, generalmente con uno o más núcleos iguales. Dividido en tres subphylum, el subphylum Mastigophora agrupa a todos los organismos que se desplazan mediante uno o varios flagelos, pueden ser organismos de vida libre o parásitos, solitarios o coloniales. Subdividido en dos clases, la clase Zoomastigophorea comprende organismo predominantemente parásitos, con uno o varios flagelos, algunas especies presentan formas amebiodes. Su estructura varía desde un tipo sencillo hasta algunos sumamente complejos (Martínez Pérez y Elías Gutiérrez, 1985).

Trypanosoma cruzi (Figura 1) es un parásito flagelado perteneciente al orden Kinetoplastida. En este orden se ubican varios géneros que incluyen parásitos de invertebrados (*Leptomonas* y *Crithidia*), de plantas e invertebrados (*Phytomonas*), así como

de vida libre (*Proleptomonas*) y de vertebrados e invertebrados (como *Trypanosoma* y *Leishmania*) siendo estas últimas, las especies más estudiadas ya que parasitan al hombre (Cevallos y Hernández, 2002). Todos los miembros del orden Kinetoplastida están caracterizados por tener un organelo llamado cinetoplasto, poseen uno o dos flagelos desiguales que se originan de una depresión, la forma del cuerpo puede variar de oval a alargada en forma de hoja. Este orden comprende dos subórdenes. Los representantes del orden Trypanosomatida (como *T. cruzi* y *T. brucei*) revisten gran importancia debido a que son parásitos tanto del hombre como de animales domésticos. Presentan un ciclo biológico polimorfo (discutido más adelante), la reproducción es de tipo asexual por fisión binaria o múltiple (Martínez Pérez y Elías Gutiérrez, 1985).

Con frecuencia se habla indistintamente de *T. cruzi* y de *T. brucei*; sin embargo, pertenecen a subgéneros diferentes y por consiguiente presentan aspectos biológicos característicos. En contraste *T. brucei* vive y se replica en el torrente sanguíneo, mientras que *T. cruzi* es un parásito intracelular del hospedero vertebrado, *T. brucei* se inocula mediante el piquete del vector mientras que *T. cruzi* es depositado *in situ* arrastrado por las heces del vector hematófago que defeca después de la ingesta sanguínea. En otros aspectos, los vectores de transmisión pertenecen a géneros distintos, y producen enfermedades distintas. *T. brucei gambiense* o *T. brucei rhodesiense* causan la enfermedad del sueño, las subespecies *T. brucei brucei* produce enfermedad en el ganado y la subespecie *T. cruzi* produce la enfermedad de Chagas (Cevallos y Hernández, 2002). Geográficamente ambos se distribuyen diferencialmente encontrando a *T. brucei* en África, mientras que *T. cruzi* se encuentra en América, por lo que suele referirse a estos organismos como tripanosomas africanos y tripanosomas americanos (Cevallos y Hernández, 2002; Cabello, 1998; Delgado *et al.*, 1994).

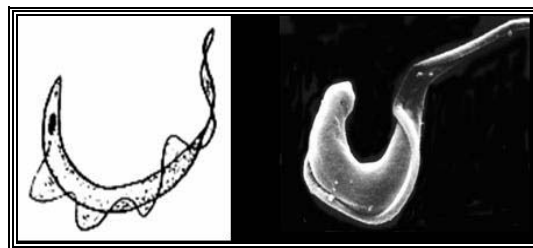


Figura 1 *Trypanosoma cruzi*, estadio de tripomastigote sanguíneo, forma infectiva en el huésped mamífero.

1.1.3 Morfología y Características Estructurales

Dentro de *T. cruzi* se han descrito estructuras celulares únicas entre los protozoarios, una de las características sobresalientes de estos organismos es el conjunto de microtúbulos (polímeros lineales de alfa y beta tubulina) subpeliculares, conformando un citoesqueleto periférico de gran rigidez, pero con funciones más complejas en el proceso de diferenciación celular, movilidad y migración de tejidos. Los microtúbulos subpeliculares se distribuyen en toda la membrana citoplásmica, excepto en el área donde emerge el flagelo, esta región es de gran importancia para la célula, ya que es el único sitio donde se realiza endocitosis o exocitosis de moléculas.

Otra estructura especializada de *T. cruzi* es el cinetoplasto, el cual se observa como una red fibrosa con ADN que constituye el 20-25% del ADN total del parásito. Algunos estudios han revelado que las moléculas de ADN del cinetoplasto se encuentran organizadas y asociadas en minicírculos y maxicírculos. Los primeros forman la mayor parte de la estructura (5000-10 000 moléculas por célula), son moléculas circulares de ADN con una longitud perimetral de 100 a 2500 pb. Se sabe que los minicírculos codifican para ARNs pequeños que participan en el procesamiento (por edición) de ARNs mensajeros mitocondriales. Los maxicírculos son moléculas mayores de ADN, que contienen una longitud perimetral de 30,000-50,000 pb. Se encuentran en mucho menor número que los minicírculos (50 copias por célula) y representan el equivalente al ADN mitocondrial de otros eucariontes, pues codifican por ARNs codificadores de proteínas, ARNs ribosomales y de transferencia mitocondriales.

Se ha descrito un flagelo demostrado como una estructura estereotípica de un sistema 9 + 2, el cual está conectado al cuerpo basal y emerge de una invaginación especializada. (Cevallos y Hernández, 2002; Wendel S., 1992).

Durante su ciclo de vida *T. cruzi* presenta distintas morfologías que pueden ser fácilmente identificadas bajo microscopia de luz. Dentro de estas morfologías se han

caracterizado principalmente cuatro estadios (Figura 2); de los cuales, tres son de gran importancia en la investigación:

a) Amastigote, estadio caracterizado por presentar un flagelo corto y morfología esférica, generalmente de 3 a 5 μ m, en el se han observado vacuolas, ribosomas y cuerpos lipídicos densos, presenta modificaciones en el cinetoplasto, el cual se observa como un cuerpo oscuro cerca del núcleo, esta es la forma replicativa intracelular del parásito, aunque se han encontrado en el intestino del huésped invertebrado así como en sangre de vertebrados infectados.

b) Epimastigotes, este estadio se ha observado como una forma oval alargada de 20-40 μ m de longitud, su cinetoplasto se localiza en la parte media del organismo en la parte anterior al núcleo, este último presenta una forma redonda. Se puede identificar un flagelo que emerge de la parte media del parásito el cual empieza a formar una membrana ondulante más pequeña que la observada en tripomastigotes. Estas son formas replicativas y son encontradas en el intestino del huésped invertebrado, por otro lado son capaces de dividirse en cultivos axénico donde se pueden observar en fase logarítmica de crecimiento, se han podido encontrar epimastigotes en células de vertebrados, los que se han visto hacia el final del ciclo intracelular cuando los amastigotes se transforman a tripomastigotes o al inicio de un nuevo ciclo donde los tripomastigotes se transforman a amastigotes.

c) Tripomastigotes sanguíneos, este estadio observado en sangre periférica del huésped mamífero, se ha descrito como una población compuesta por una mezcla de dos morfologías básicas: delgadas y anchas. Estas formas son resultado del cambio de estadio replicativo a estadio no replicativo-infectivo. El tripomastigote tienen una longitud de aproximadamente 25 μ m y un diámetro de 2 μ m, su cinetoplasto se localiza en posición posterior al núcleo. Su flagelo emerge cerca del extremo anterior del parásito y se dobla hacia delante, formando una membrana ondulante a lo largo de todo el cuerpo saliendo en forma libre en su extremo posterior. Este estadio puede ser observado en células de tejido y sangre del huésped vertebrado, en la parte final del intestino, en heces y orina del huésped

invertebrado, en la fase estacionaria de crecimiento en cultivos axenicos y en la fase líquida de cultivos celulares. Estas formas no son capaces de dividirse.

d) Tripromastigote metacíclico (promastigote) se ha visto como una estructura alargada de unas 8µm de longitud con un núcleo central, en el extremo anterior se observa el cinetoplasto de donde emerge un flagelo corto (Tyler y Engman, 2001; Tyler y Engman, 2000; Almeida-de-Faria *et al.*, 1999; Brener, 1973).

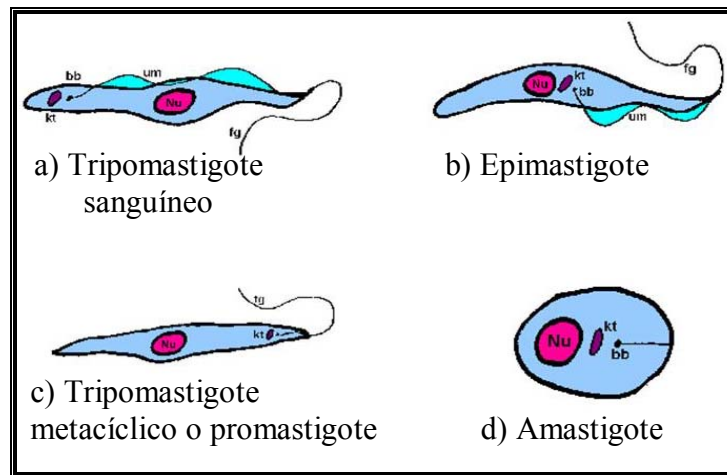


Figura 2 Morfología de *Trypanosoma cruzi*. Se ha identificado principalmente cuatro estadios o morfologías en *T. cruzi* diferenciándose entre si por la posición del cinetoplasto (kt) con relación al núcleo (Nu), por la presencia o ausencia de la membrana ondulante (um) y el flagelo (fg). a) tripomastigote sanguíneo el cinetoplasto se localiza posterior al núcleo, el flagelo emerge del extremo posterior y se dobla hacia delante a lo largo del cuerpo del parásito, formando una membrana ondulante saliendo en forma libre en su extremo anterior. b) epimastigote, en esta forma el cinetoplasto se encuentra localizado en la parte media del organismo justo por delante del núcleo. El flagelo emerge de la parte media del parásito y forma una membrana ondulante más pequeña que la observada en los tripomastigotes. c) tripomastigote metacíclico o promastigote tiene el cinetoplasto en la parte anterior y un flagelo libre sin membrana ondulante. d) amastigote es más esférico y no tiene flagelo libre. El cinetoplasto se ve como un cuerpo oscuro cerca del núcleo.

1.1.4 Ciclo de Vida

Durante su ciclo de vida, *T. cruzi* se presenta en varios estadios, manifestando un ciclo de vida bifásico (Figura 3) entre huéspedes vertebrados, donde las infecciones son establecidas, y huéspedes invertebrados que sirven como vectores para la transmisión. El

proceso de infección se inicia cuando los insectos como *Rhodinus proxilus*, *Panstrongylus megistus* y principalmente *Triatoma infestans*, pertenecientes a la familia Reduviidae, se alimentan de la sangre de mamíferos infectada con las formas de tripomastigotes. Ya en el interior del insecto y a lo largo de su tracto digestivo, el parásito sufre una serie de transformaciones primero a epimastigotes y posteriormente a tripomastigotes metacíclicos antes de ser expulsado en las heces. En el estomago del insecto, los tripomastigotes se redondean formando amastigotes en la parte media del intestino en donde se transforman a epimastigotes que se replican repetidamente mediante fisión binaria y finalmente aproximadamente dos semanas después, llegan al recto, donde se unen a la cutícula cerosa de la pared del intestino para diferenciarse en la forma metacíclica de tripomastigotes. Este estadio esperará a ser expulsado con las deyecciones que deposita el parásito en la herida causada con la probóscide en la membrana mucosa durante la ingesta sanguínea, penetrando y alcanzando así a su huésped secundario. El prurito producido por la picadura, a menudo da como resultado una infección causada por rascado o frotamiento de la herida en la piel o mucosas cercanas, por donde el parásito entra al organismo. Los estadios de *T. cruzi* en el vertebrado, son parásitos obligados intracelulares capaces de invadir y replicarse dentro de una amplia variedad de células fagocíticas y no fagocíticas, una propiedad que asegura que el ciclo de vida se complete (Tyler y Engman, 2001; Kolien y Schaub, 2000; Mortara *et al.*, 1999; Zeledon, 1997; Burleigh y Andrews, 1995; García y Azambuja, 1991; Brener, 1973).

El proceso de invasión de la célula, inicia cuando el tripomastigote metacíclico entra al huésped vertebrado, invade a las células a través de la formación de una vacuola parasitófora iniciando así el ciclo intracelular, el cual tarda un promedio de 4-5 días. El primer paso del ciclo es la disrupción de la membrana vacuolar, la cual ocurre dentro de las dos primeras horas después de la invasión. Posteriormente el parásito alcanza el citoplasma y se diferencia a amastigote, el estadio intracelular replicativo. Después de un periodo de reposo de aproximadamente 20 horas, los amastigotes se empiezan a dividir por fisión binaria con un tiempo de duplicación de aproximadamente 12 horas dando lugar hasta 500 parásitos generados por cada uno originalmente internado. Después de haber completado el periodo replicativo, los amastigotes se transforman a tripomastigotes, la célula huésped se

rompe y los parásito son liberados al torrente sanguíneo de donde pueden ser ingeridos nuevamente por el insecto vector completando el ciclo de vida. Estas formas son por lo tanto llamadas tripomastigotes sanguíneos, en el sentido que ellos pueden invadir células del vertebrado y repetir el ciclo intracelular (Tyler y Engman, 2001; Burleigh y Andrews, 1995; Ley *et al.*, 1988; Brener, 1973).

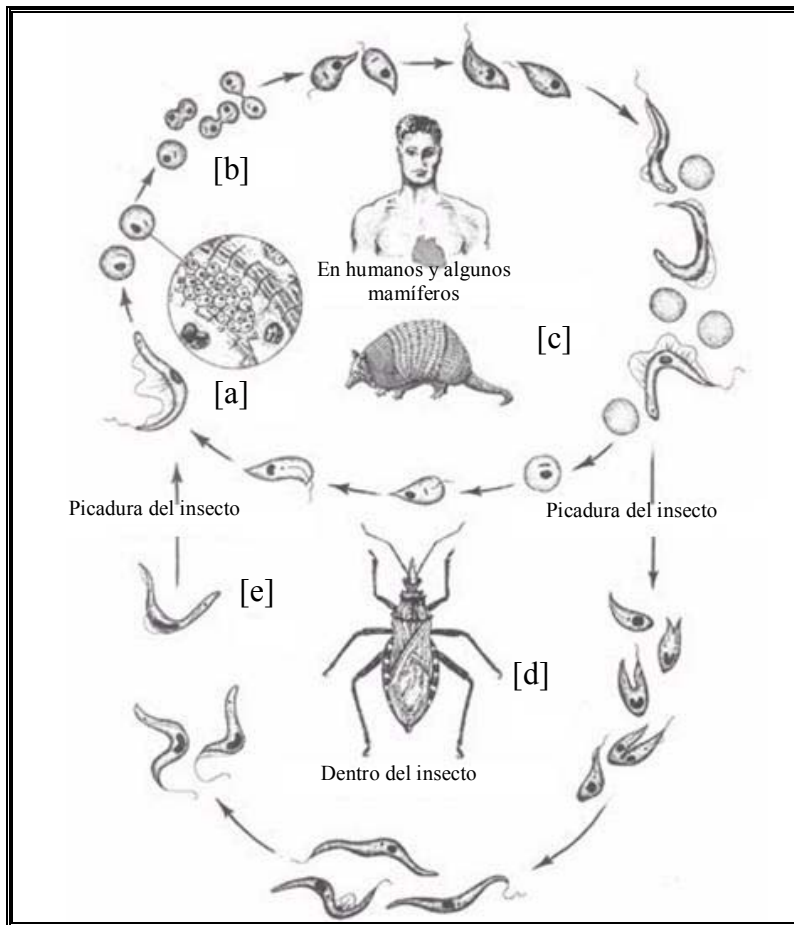


Figura 3. Ciclo de vida de *Tripanosoma cruzi*. La infección en el hombre se produce con la penetración de los tripomastigotes metacíclicos, en los macrófagos del tejido conjuntivo de la dermis o en los del tejido subcutáneo, los tripomastigotes se transforman a amastigotes (a). Estas formas intracelulares se multiplican por fisión binaria durante cuatro a cinco días (b). Una vez terminado el periodo replicativo, los parásitos se diferencian a tripomastigotes, los cuales lisan las células y llegan al torrente sanguíneo (c) donde se diseminan por el organismo invadiendo nuevas células de diferentes órganos, repitiendo continuamente el ciclo celular de diferenciación, o bien los insectos hematófagos ingieren tripomastigotes sanguíneos, así como formas intracelulares, las cuales se multiplican en el mesogastrio del insecto en forma de epimastigotes, transformándose después de 15 a 30 días en tripomastigotes metacíclicos en el recto del vector invertebrado (d). Al depositar sus deyecciones durante la ingesta de la sangre, el huésped humano se infecta con tripomastigotes cuando frota las heces contaminadas del insecto en la herida causada por la picadura en la conjuntiva, en las mucosas o en escoriaciones de la piel (e).

Un subciclo alternativo (Figura 4) puede ocurrir en el hospedero mamífero si los amastigotes originados de la lisis prematura de células infectadas -definidos como amastigotes intracelulares- (Umezawa *et al.*, 1985; Hudson *et al.*, 1984), o por diferenciación extracelular de tripomastigotes -definidos como amastigotes extracelulares- invaden fagocitos profesionales o no profesionales, donde pueden sobrevivir y continuar con el ciclo de vida del parásito (Mortara, 1991; Ley *et al.*, 1988; Andrews *et al.*, 1987; Pan, 1978). Aunque los amastigotes intracelulares son mas largos y ligeramente mas elongados que las formas extracelulares, ambos comparten similitudes inmunológicas, bioquímicas y ultra estructurales, además de que expresan marcadores específicos del estadio de amastigotes (Barros *et al.*, 1997; Pan y McMahon-Pratt, 1989; Ley *et al.*, 1988; Lima *et al.*, 1988; Andrews *et al.*, 1987; Hudson *et al.*, 1984; Villalta y Kierszenbaum, 1984 y 1982).

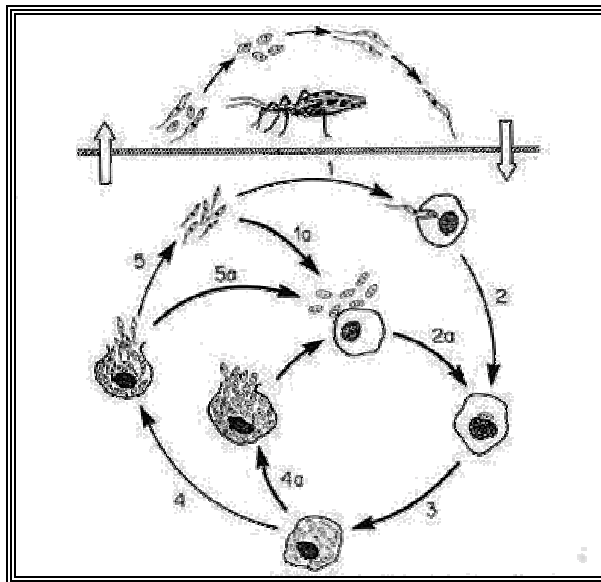


Figura 4. Subciclo alternativo de *T. cruzi*. El tripomastigote sanguíneo invade fagocitos profesionales y no profesionales (1), una vez que penetra, progresa la infección celular (2 y 3), de esta infección se liberan tripomastigotes (4) o amastigotes, originados por lisis prematura y denominados amastigotes intracelulares (4a) los tripomastigotes sanguíneos continúan en el ciclo (5) o bien pueden diferenciarse a amastigotes, conocidos como amastigotes extracelulares (5a y 1a), estos amastigotes tanto extracelulares como intracelulares pueden infectar nuevas células y continuar con el ciclo (2a).

1.1.5 Distribución

La enfermedad de Chagas sólo se encuentra restringida en América, a partir del paralelo 41° Norte en el sur de Estados Unidos de América, hasta el paralelo 45° Sur, en Argentina (Figura 5). La enfermedad se ha observado como un problema importante de salud en Brasil, Argentina, Venezuela, Chile, Perú, Bolivia, Uruguay, Paraguay, Panamá, Colombia y Ecuador. Esta enfermedad es común en América Central, México, Guyana y Guyana Francesa, pero aún su importancia en estas regiones no ha sido determinada.



Figura 5. Distribución de la enfermedad de Chagas.

Se calcula que en áreas endémicas hay cerca de 12 millones de persona infectadas y otros 35 millones están en riesgo de presentarla. En algunas regiones cerca de la mitad de la

población se encuentra afectada. Este padecimiento inicia por lo general en la infancia, y la proporción de individuos enfermos aumenta con la edad.

La distribución de la enfermedad de Chagas se relaciona con factores socioculturales. Es más frecuente en áreas rurales con bajo nivel de vida, habitación estándar, pobreza y desconocimiento de medidas higiénicas, además es de especial importancia el uso de ciertos materiales en la construcción de las viviendas; tejados de paja, de adobe, paredes de tablones y suelos sucios que favorecen la colonización de insectos (WHO, 1996; Heyneman et al., 1995; Wendel et al., 1992).

1.1.5.1 Ecología

La existencia de reservorios y vectores de *T. cruzi* así como factores particularmente poblacionales de nivel sociocultural y educacional son los más importantes para determinar la aparición de la enfermedad de Chagas. Se han podido considerar tres ciclos ecológicos en lo que se refiere a la tripanosomiasis americana: a) un ciclo selvático, en donde *T. cruzi* circula a través de una amplia gama de animales silvestres y triatomíneos, considerado como el ciclo de infección original y en el que la infección rara vez pasa al hombre, b) el ciclo paradoméstico, en el cual animales silvestres y triatomíneos se encuentran alrededor del humano y ocasionalmente penetran en el y c) el ciclo doméstico donde los triatomíneos se adaptan a la morada de los humanos, transmitiendo la infección tanto a animales domésticos como el humano (Nogueira N. y Rodríguez C., 1984).

1.1.5.2 Huéspedes Reservorios

Los huéspedes reservorios de *T. cruzi* juegan un papel fundamental en los diferentes ciclos; el ciclo silvestre, el cual solo se da en animales salvajes (donde la infección rara vez pasa al hombre y a animales domésticos). En humanos y animales domésticos que es el resultado de la adaptación de los triatomíneos a las viviendas, la transmisión del parásito es de animal a animal, animal a humano y humano a humano. Muchos seres salvajes se infectan en forma natural incluyendo marsupiales, armadillos, roedores, murciélagos y

primates. *T. cruzi* se transporta desde un foco natural a las casas como resultado de la entrada de animales selváticos o por medio de transporte o atracción de triatomíneos a las viviendas. Cuando se presenta este tipo de transmisión, los principales reservorios de *T. cruzi* son perros, gatos e incluso la rata común. Algunos reservorios domésticos pueden ir de acuerdo a la ecología y región que habitan las personas (ejemplo en Bolivia y Perú) donde animales como lo son el cerdo de Guinea puede jugar un papel muy importante en el ciclo ya que se crían en las casas como una fuente de alimento y funcionan como reservorios, así como para la transmisión de la enfermedad en el humano (Cabello R. C., 1998; Heyneman *et al.*, 1995; Wendel. *et al.*, 1992).

1.1.6 Epidemiología

Empleando protocolos estandarizados se demostraron 18 millones de casos en 21 países endémicos con 100 millones de personas en riesgo de infección. De acuerdo con los datos del Banco Mundial en 1993 se estableció que la enfermedad de Chagas en Latinoamérica ocupa el primer lugar entre las enfermedades tropicales y el cuarto entre las enfermedades transmisibles. Su distribución geográfica abarca desde el sur de los Estados Unidos hasta el sur de Argentina. Principalmente en Centro y Sur América (Morel C., 1999; WHO, 1996; Heyneman *et al.*, 1995; Wendel S. *et al.*, 1992).

En México se han confirmado más de 400 casos agudos en los 23 estados situados al sur del Trópico de Cáncer. Los datos de casos crónicos e indeterminados no siempre han sido registrados apropiadamente. Sin embargo, el número de infectados podría ser mucho mayor, ya que un estudio seroepidemiológico mostró que hay un 1.6% de casos seropositivos en todo el país siendo mayor la prevalencia en la región central de la Huasteca, que es una área tropical que incluye parte de los estados de Hidalgo, San Luis Potosí, Veracruz y Tamaulipas. También, se han detectado nuevos focos de endemia, en estados como Chiapas e Hidalgo. Una encuesta serológica de 65000 donadores de sangre mostró una prevalencia del 1.5% de anticuerpos anti-*T. cruzi*, siendo mayor la prevalencia en la Huasteca y en el sureste del país. En este mismo estudio, se observó que los estados económicamente más pobres como Hidalgo, Oaxaca y Chiapas, mostraron tres veces más

riesgo de transmisión de *T. cruzi* que Baja California, Nuevo León y Chihuahua (Guzmán-Bracho, C. 2001). Apoyando lo anterior en otro estudio hecho por el centro Nacional de Transfusión Sanguínea se encontró hasta un 3.5% de bolsas contaminadas con el parásito.

En la Republica Mexicana se distribuyen un total de 31 especies de triatomos dentro de los cuales, los que tienen relevancia epidemiologica en la transmisión de *T. cruzi* a humanos son: *Rhodnius prolixus*, *Triatoma barberi*, *Triatoma dimidiata*, *Triatoma gerstaecken*, *Triatoma mazzutti* y *Triatoma mexicana*.

1.1.7 Forma de Transmisión

La forma metacíclica de *T. cruzi*, que es la que se encuentra en las heces del huésped invertebrado es la forma infecciosa del parásito. El estadio de tripomastigote metacíclico es depositado con las deyecciones que expulsa el parásito después de alimentarse y es la manera en que externamente se contamina inicialmente el huésped vertebrado, el parásito puede penetrar en la piel del vertebrado a través de la herida causada por la picadura del vector, o por otras abrasiones o excoriaciones que resultan del rascado. Si son llevados a ojos o boca en forma accidental, penetran con facilidad en mucosas. La transmisión congénita se ha observado en un 2 a 4% de los recién nacidos de madres infectadas con *T. cruzi*. Además se han informado casos de infección por transfusión sanguínea, donde se ha podido observar que esta forma de infección puede ser más frecuente de lo que se sospecha. Otra forma por la que se puede adquirir el parásito son los accidentes de laboratorio, en aquellos lugares donde se manipula al organismo directamente. En animales es común la ingesta accidental del insecto reservorio, siendo esta una vía de administración del parásito. Los animales de vida salvaje y roedores presentan síntomas después de ingerir triatomos infectados. La transmisión de vector a vector es resultado de la coprofagia o de que una chinche picuda absorba sangre contaminada de otra (Heyneman *et al.*, 1995; Wendel S. *et al.*, 1992).

1.1.7.1 Vectores

La transmisión en los ciclos de *T. cruzi* es compleja, en América se han registrado más de 130 especies de triatomíneos, de los cuales muchas especies se han reportado como portadores de *T. cruzi* pudiéndose observar en amplios habitats, donde se incluyen palmeras, árboles, plantas epifitas, cuevas, ranuras en rocas y otros refugios animales. La transmisión del ciclo ocurre muy frecuente en zonas selváticas. En los casos de transmisión doméstica es muy raro encontrar colonias de triatomíneos. Así, son muy pocas las especies de triatomíneos adaptados a colonizar casas, transmitiendo de esta forma el parásito al humano y a otros animales domésticos (Miles *et al.*, 2003).

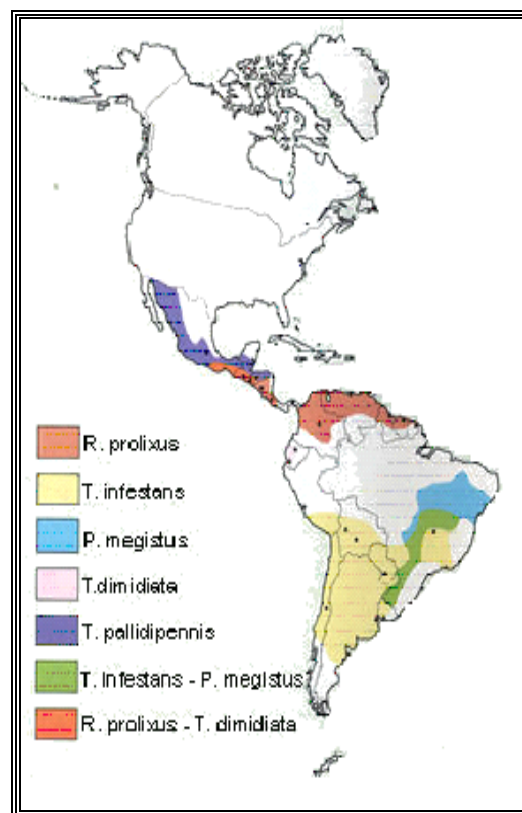


Figura 6. Distribución de los principales vectores de *T. cruzi*.

Aunque *T. cruzi* se puede encontrar en otros artrópodos esofágicos (ejemplo la chinche *Cimex*) los únicos transmisores naturales son las chinches pertenecientes al orden hemiptera, familia Reduviidae, subfamilia Triatominae. Aún cuando se conocen muchas

especies de triatominos, pocos son los que tienen significancia epidemiológica en la enfermedad de Chagas, ya que muchos de estos organismos habitan zonas selváticas y raramente se encuentran en contacto con los humanos, aunque algunas especies se han adaptado a ambientes domésticos representando una alta significancia como vectores. En este aspecto los vectores más importantes son las especies *Triatoma infestans* en países del cono sur como Argentina, Bolivia, Brasil, Chile, Paraguay, Perú y Uruguay. *Triatoma brasiliensis* en el noreste de Brasil, *Rhodnius prolixus* y *Triatoma dimidiata* en las regiones al norte del Amazonas (Figura 6). En México los principales vectores son *Triatoma phyllosoma*, *Triatoma dimidiata* y *Rhodnius prolixus*. Estas especies se han adaptado a las habitaciones de los humanos, generalmente en chozas y habitaciones donde las condiciones de las casas rurales son pobres, estos organismos emergen por las noches alimentándose de sangre de personas que duermen o de animales domésticos.

Los insectos triatominos (Figura 7), tienen alas cortas y sus recorridos los hacen a distancias cercanas, son nocturnos y difícilmente se detectan aunque sean abundantes ya que se esconden en las grietas de los ladrillos de adobe o en los techos de paja durante el día. Son succionadores de sangre obligados, viviendo cerca de sus fuentes de alimento, algunas especies prefieren huéspedes específicos y otras no discriminan. Pican la piel y succionan sangre de los capilares a través de su larga probóscide sin provocar dolor, una comida de sangre la completan alrededor de 20 minutos. Puesto que los microorganismos solo se transmiten por las heces del insecto, los factores cruciales para la transmisión son 1) que la chinche los elimine mientras se alimenta o después de dejar el vertebrado y 2) la posición en la que se encuentre sobre su huésped al defecar; estos factores varían entre las especies y cepas. Otros datos importantes que determinan la probabilidad de la infección humana son la proximidad del vector a las habitaciones de los individuos, el grado o intensidad de los servicios domiciliarios y la agresividad del insecto. En la actualidad la transmisión se lleva a cabo en algunas áreas urbanas como resultado de la tendencia de algunas especies de invadir edificios en grandes ciudades (WHO, 1996; Heyneman et al., 1995; Wendel et al., 1992).



Figura 7. Insecto hematófago conocido como “chinche besucona”, hemíptero perteneciente a la familia *Reduviidae*.

1.1.8 Interacción Huésped-Parásito

Generalmente ha sido aceptado que después de penetrar al huésped mamífero, los tripomastigotes metacíclicos son atrapados por los macrófagos en donde se multiplican como amastigotes. Después de un tiempo determinado los parásitos transformados a tripomastigotes rompen las células y son vertidos al torrente sanguíneo llegando a otros tejidos (Nogueira N. y Rodríguez C., 1984), en este aspecto se ha podido sugerir que después de una fase aguda, el tripomastigote se refugiara en las células del sistema reticuloendotelial, donde se iniciara la fase crónica de la enfermedad (Chester B. *et al.*, 1986), en animales de laboratorio se ha podido observar que diferentes cepas de *T. cruzi* muestran parasitismo selectivo para diferentes tejidos, esto bajo condiciones experimentales específicas. Algunas cepas han sido consideradas como miotrópicas, invadiendo comúnmente músculo liso, esquelético y corazón, muchas otras cepas han sido llamadas macrófagotrópicas pues se ha observado que interactúan predominantemente con macrófagos. En humanos no se ha podido demostrar la existencia de un tropismo hacia un tejido específico (Nogueira N. y Rodríguez C., 1984).

1.1.9 Patología

Seguido de la penetración y establecimiento en la piel o membrana mucosa los tripomastigotes metacíclicos son fagocitados por macrófagos u otras células locales. Una vez internalizado el organismo, se replica en el citoplasma, causando la ruptura de la célula y la generación de una reacción inflamatoria de intensidad variable. La infección por *T.*

cruzi tiene un periodo de incubación de cuatro a diez días, casi siempre sin síntomas, posteriormente puede presentar tres fases:

1.1.9.1 Fase aguda

Puede durar de uno a cuatro meses. Cuando ocurre en niños puede ser desde asintomática hasta grave o fatal. Se caracteriza por fiebre variable, malestar general, irritabilidad, dolor de cabeza, crecimiento de hígado, bazo y ganglios.

En esta fase es común encontrar una reacción inflamatoria local de tejidos blandos, con crecimiento de los nódulos linfáticos dando origen a un nódulo oftalmo-linfoide (signo de Romaña Figura 8) o del nódulo linfocutáneo (Chagoma). Con el desarrollo de la parasitemia, cualquier tipo de célula se puede infectar, aunque hay predilección por el miocardio, músculo liso y células glias. Las manifestaciones que amenazan la vida o que son mortales incluyen inflamación del músculo del corazón así como el cerebro y las meninges. Durante esta etapa el diagnóstico de la enfermedad es muy difícil y a veces suele confundirse con otras enfermedades.

1.1.9.2 Fase Indeterminada

No se encuentran signos o síntomas. Sin embargo, las pruebas serológicas son positivas y si se estudia adecuadamente al paciente, se encontrarán datos sugestivos de miocarditis.

1.1.9.3 Fase Crónica

Las manifestaciones aparecen casi siempre en personas de 20 a 50 años de edad. La enfermedad cardíaca generalmente conduce a la muerte. También se observan algunos órganos agrandados (visceromegalias o dilatación visceral), especialmente el esófago y el colon; con menos frecuencia se encuentran formas que afectan al sistema nervioso central, o bien la inflamación de mucosas y glándulas. Después de un periodo asintomático de

muchos años, el 27% de esos infectados desarrollan los síntomas cardíacos que pueden conducir a la muerte repentina, 6% desarrollan alteraciones en el sistema digestivo principalmente megavisceras y el 3% presentaran alteración nerviosa periférica (Cevallos et al., 2002; Cabello R. C., 1998. y Heyneman *et al.*, 1995).



Figura 8. Signo de Romãña.

1.1.9.4 Inmunología

El mecanismo inmune por parte del huésped, esta envuelto por la resistencia a *T. cruzi* y el control del parasitismo durante la fase crónica de la infección, donde la inmunidad se adquiere después de establecida la infección, con esto se logra una reducción importante de los tripomastigotes en sangre periférica durante la etapa crónica. La importancia de los anticuerpos en resistencia a *T. cruzi* se ha observado asociada de forma primaria en la fase crónica de la infección por este microorganismo, favoreciendo el desarrollo de anticuerpos, en inicio IgM y después IgG, donde el efecto puede depender de la inmunofagocitosis del organismo por macrófagos más que por una lisis inmune por la presencia del complemento (Nogueira N. y Rodríguez C., 1984). La reacción inmunológica del huésped parece ser una respuesta primaria mediada por células. La función protectora de los anticuerpos es mayor durante la infección aguda (Heyneman *et al.*, 1995).

1.1.9.5 Diagnostico

El diagnostico parasitológico se puede establecer en todos los casos agudos (incluyendo las infecciones congénitas) hasta seis semanas después de la infección, pero sólo es posible en el 40 % de los casos crónicos. Las pruebas serológicas por si solas

brindan un diagnóstico presuntivo. *T. rangeli* es no patógeno y se encuentra en sangre humana en las regiones de América central y la parte norte de América del sur, por lo que se debe diferenciar de *T. cruzi* (Heyneman *et al.*, 1995).

El diagnóstico se basa en la búsqueda e identificación de las distintas formas de *T. cruzi* que parasitan al organismo humano, para ello se pueden realizar frotis de sangre, hemocultivos, xenodiagnóstico, electrocardiografía, radiología, serología, inmunofluorescencia, biopsia y la inoculación de animales receptivos. (Heyneman *et al.*, 1995; Chester B. *et al.*, 1986).

1.1.10 Prevención y Control

El control del vector constituye el elemento básico de la lucha antichagásica, dado que más del 80% de la transmisión se efectúa por vía vectorial en el ámbito doméstico. Las principales estrategias para luchar contra los triatomas son la acción directa con los insecticidas, la mejora de las viviendas y la educación sanitaria, buscando evitar el contacto directo con el hombre susceptible a estos insectos.

La prioridad principal del control de la enfermedad de Chagas es interrumpir la transmisión dentro del hogar. Se puede lograr en un tiempo corto rociando insecticidas, si las especies del vector triatómico presentan hábitos domiciliarios en forma única. Sin embargo cuando hay repoblación con triatomos selváticos es necesaria la vigilancia con insecticidas selectivos en forma continua. En Brasil y Argentina se utiliza Lindano y en Venezuela Dieldrin. Sin embargo está prohibido usarlos en agricultura, además cada vez es más difícil contenerlo. En la actualidad se han estado usando insecticidas biodegradables como los compuestos organofosforados, carbonatos y piretroides. Otra forma de exterminar a los triatomos es por control biológico, esterilización del macho, hormonas juveniles, inhibidores de la formación de quitina y sustancias de atracción para el macho las cuales hoy en día se encuentran en experimentación.

El control a largo plazo de la enfermedad de Chagas requiere mejorar los materiales de construcción de las casas y mejorar la educación sanitaria en la población. Ya que es imposible interrumpir el ciclo selvático de *T. cruzi*, los animales pueden actuar como reservorios potenciales, por esta razón los animales deben mantenerse lejos de las viviendas y pueblos.

Se puede evitar la transmisión por transfusión de sangre seleccionando de forma adecuada a los donadores y agregando cristales de violeta de gentian (0.25gr/Lt) a la sangre 24 horas antes de usarla (Heyneman *et al.*, 1995; Esquerdo G. F., 1993.).

1.1.11 Tratamiento

Se cuenta con dos medicamentos para el tratamiento específico de la enfermedad: Nifurtimox (8 a 16mg/Kg dividido en tres dosis por 50 a 120 días) y Benzonidazol (5 a 7mg/Kg por 60 días), de los cuales este último es el de elección. En la etapa aguda se debe de administrar con rapidez este tratamiento dando como resultado una mejora en los síntomas y los tripanosomas desaparecen de la sangre periférica en cinco días y las pruebas serológicas y el genodiagnóstico se vuelven negativos. La inoculación accidental en laboratorio amerita el control inmediato por 10 días para prevenir la infección. En casos crónicos se logra la reducción de la parasitemia y revertir el xenodiagnóstico positivo, pero no sucede lo mismo con la prueba serológica que pocas veces se vuelve negativa. El tratamiento no mejora la función cardíaca, las manifestaciones clínicas, ni la progresión de la enfermedad. Los resultados obtenidos en diferentes países difieren, tal vez debido a que son otras cepas y a la diferente susceptibilidad de los medicamentos.

Los efectos secundarios que ocasiona el Nifurtimox son anorexia, pérdida de peso, nerviosismo, insomnio, temblor, y neuritis periférica. Son raras las alucinaciones y convulsiones. Con la administración del Benzonidazol son náuseas, cefalea, anorexia, dolor abdominal, pérdida de peso, mareos, vómito, dermatitis exfoliativa y trombocitopenia.

Como ya se había mencionado anteriormente hay dos etapas de la enfermedad de Chagas adquirida, la aguda y la crónica, y la forma congénita de la infección. La historia natural de la enfermedad no es del todo conocida. Se cree que persiste de por vida. Un número de personas afectadas inician de forma asintomática y persisten así por mucho tiempo. Otras, después de recuperarse de un cuadro agudo también permanecen sintomáticas indefinidamente. Sin embargo un gran grupo de individuos con la enfermedad, antes de presentar síntomas durante la etapa crónica, pasan por un periodo latente prolongado. A la fecha no hay vacuna disponible para la enfermedad de Chagas (Cevallos *et al.*, 2002; Cabello R. C., 1998).

1.1.12 Proceso de Infección

T. cruzi es un parásito intracelular obligado capaz de infectar a un gran número de células nucleadas a través de un proceso endocítico en el que participa la formación de una vacuola parasitófora. El mecanismo molecular mediante el cual el tripomastigote es reconocido e internado por las células huésped esta aún en debate. Originalmente se asumió que este proceso era similar al mecanismo de entrada de muchas bacterias patógenas, en donde se moviliza el citoesqueleto de actina de la célula huésped en un proceso tipo fagocitosis. Sin embargo; estudios posteriores, mostraron que el proceso de invasión de la célula huésped por *T. cruzi* es un evento complejo que parece involucrar diversas etapas, iniciando con la unión del parásito a la célula huésped (Brenner, *et al.*, 1973). En los primeros momentos de interacción con la célula huésped, se ha sugerido la participación de fosfolípidos del parásito tanto en la unión como para disparar mecanismos de transducción de señal que activan genes específicos requeridos para la invasión y la diferenciación celular (Garrido *et al.*, 2000).

El mecanismo de internación del parásito hacia la célula huésped requiere de diversos pasos. Durante esta unión, se ha observado el reclutamiento de lisosomas, un proceso aparentemente disparado por la interacción e invasión de la célula huésped por *T. cruzi*, sugiriéndose que el parásito activa señales de transducción para inducir dicha movilización de lisosomas involucrándose en este proceso la participación de fosfolipasa C

con formación de Inositol Trifosfato (IP₃) y una movilización de calcio intracelular, aumentando sus concentración en citoplasma (Rodríguez *et al.*, 1995; Tardieux *et al.*, 1994; Schenckman y Moratara, 1992).

Una vez llevados los lisosomas al sitio de unión del parásito, estos se fusionan entre ellos y con la membrana plasmática para permitir la entrada del parásito a través de una vacuola que los transportara hacia la periferia nuclear de la célula. En estos aspectos algunos estudios reportan que solo los lisosomas que se encuentran en la periferia del sitio de unión del parásito con la célula, son los que se reclutan para la internación del parásito (Rodríguez *et al.*, 1996; Burleigh y Andrews, 1995; Tardieux *et al.*, 1992).

Así mismo se ha observado que las concentraciones de calcio intracelular evocan la exocitosis de los lisosomas, siendo modulados por niveles intracelulares de AMPc, indicando que el AMPc generado en la célula, es una respuesta a la interacción del tripomastigote con está y que tiene un papel en el proceso de reclutamiento y fusión con la membrana plasmática de los lisosomas (Rodríguez *et al.*, 1999).

Se ha sugerido también, que el reclutamiento de los lisosomas es mediado por microtúbulos (Rodríguez, 1996). En donde aún cuando no se observaron cambios significativos en su distribución, si se observa un contacto frecuente entre los amastigotes y los microtúbulos en células infectadas con *T. cruzi* (Carvalho *et al.*, 1999).

La participación del citoesqueleto de actina en este proceso, se ha mostrado variable de acuerdo al modelo celular utilizado, por ejemplo en células NRK y MDCK el proceso de invasión mostró ser independiente de actina (Burleigh y andrews, 1995; Tardieux *et al.*, 1992), mientras que en células Vero la invasión de estas por el parásito requirió de la participación del citoesqueleto de actina, observándose su acumulación en la región de internación del parásito y la inhibición del proceso de invasión cuando estas células son tratadas con citocalacina D revelando que la actina de las células huésped juega un papel importante en el proceso de internación del parásito mediante la vacuola endocítica.

Con estos procesos se ha sugerido que *T. cruzi* puede penetrar a la célula huésped por tres mecanismos, uno que corresponde a un típico proceso fagocítico que envuelve la

formación de proyecciones tipo filopodial que dependen de la acumulación de filamentos de actina, el segundo considerado como un proceso endocítico que no depende de la formación de proyecciones tipo filopodiales, pero que depende de la acumulación de filamentos de actina para internar al parásito y el tercero, un proceso endocítico que no depende de los filamentos de actina (Fonseca, 2002). Finalmente se a sugerido que la vacuola parasitófora es lisada por enzimas posiblemente liberadas por el parásito, mismos que durante este proceso se transforman gradualmente a amastigotes los cuales después de 24 horas se multiplican libremente en el citoplasma continuando así con su ciclo de vida (Ley *et al.*, 1990; Carvalho *et al.*, 1989).

1.1.13 Moléculas del Parásito Involucradas en el Proceso de Infección

Indudablemente muchas proteínas son muy importantes durante el proceso de infección del parásito así como para completar su ciclo de vida, sin embargo muy pocas han sido demostradas experimentalmente. Un factor del parásito probablemente involucrado en el proceso de infección fue identificado originalmente como una actividad hemolítica estable en condiciones ácidas llamada TC-TOX (Adrews, 1990; Andrews *et al.*, 1990). Posteriormente, se reportó una segunda proteína que se ha demostrado genéticamente, tiene un papel importante en la invasión celular, llamada oligopeptidasa B (Caler *et al.*, 1998; Burleigh *et al.*, 1997). En el caso de ésta última se cuenta con evidencias experimentales que demuestra su importancia en el proceso de infección sin embargo en el caso de TC-TOX esta evidencia es solo indirecta ya que esta limitada a la demostración *in vitro* de su papel en la lisis celular permaneciendo en debate aún si es o no requerida durante el proceso de infección.

LYTI es la segunda proteína que en base a evidencias genéticas se mostró es requerida no solo para una infección eficiente si no también que esta involucrada en el proceso de transición de estadio del parásito. Usando metodologías genéticas nuestro grupo reportó que *LYTI* no es esencial en epimastigotes, sin embargo parásitos deficientes en *LYTI* mostraron tres fenotipos sobresalientes. Estos parásitos son deficientes en infección, presentan un desarrollo acelerado *in vitro*, y una actividad hemolítica disminuida

(Manning-Cela *et al.*, 2001). El como una molécula esta involucrada en fenotipos tan diversos fue contestado por experimentos de extensión 5' y RT-PCR. Los resultados indicaron un *trans-splicing* alternativo regulado diferencialmente en los distintos estadios de desarrollo del parásito, que produce tres transcritos diferentes dos de los cuales codifican para la proteína completa conteniendo una posible secuencia señal y una que codifica para la proteína truncada sin la posible secuencia señal y en la que sería factible se utilice la secuencia nuclear también contenida. Consecuentemente es posible que dos formas de la proteína sean producidas, una secretada que participe en la hemólisis e infectividad del parásito y una segunda, citoplásmica o nuclear, que podría participar en el desarrollo de estadio del parásito (Manning-Cela *et al.*, 2002).

1.1.14 Proceso de Unión del Parásito a la Célula Huésped

Diversas evidencias experimentales indican que la interacción de los tripomastigotes con la célula huésped es mediada por moléculas específicas tanto del parásito como de la célula huésped (Burleigh y Andrews, 1998; Andrews *et al.*, 1995; Procopio *et al.*, 1994; Araujo-Jorge *et al.*, 1992; Nogueira *et al.*, 1976). Se ha observado un aumento en la expresión de moléculas de adhesión en células neurales (NCAM) en la miocarditis producida en la enfermedad de Chagas sugiriendo que NCAM puede actuar como un receptor en el proceso de unión e invasión celular por el parásito (Soler *et al.*, 2001). Otro receptor cuya sobre-expresión en células endoteliales de vena umbilical (HUVECS) y de ovario de hámster chino (CHO) mostró potenciar el proceso de invasión de la célula huésped por *T. cruzi*, es bradikinina B (Scharfstein *et al.*, 2000). Las capas de la superficie de estadios de desarrollo de *T. cruzi* esta compuesta principalmente por dos familias de glicoproteínas unidas a glicosilfosfatidilinositol, las glicoproteínas (gp) tipo mucina y la familia de las trans-sialidasas (TS). Ambas son codificadas por una gran familia multigénica. Las mucinas contienen una cadena polipeptídica con dominios ricos en treonina que son modificados extensivamente con glicanos cortos unidos a O. Una función primaria de algunos de las gp trans-sialidasas (60 a 250 kDa) es la de transferir ácido siálico de gp huésped al residuo de galactosa terminal en los glicanos unidos a la O de la mucina. Otros miembros de esta familia carecen de actividad traes-salidaza pero pueden ser

importantes ligandos para receptores de la célula huésped. Se piensa que la sialilación de la cubierta de mucina protege a los estadios extracelulares de *T. cruzi* de la lisis por complemento y opsonización con anticuerpos anticarbohidratos en suero de humanos y juegan un papel en la invasión de *T. cruzi* de un amplio rango de células animales. Las proteínas relacionadas con gp85 y miembros de la familia TS forman una población heterogénea de glicosilfosfatidilinosidos anclados a glicoproteínas de la superficie del tripomastigote los cuales se a sugerido tienen un papel importante en el reconocimiento y unión a la célula huésped, además de activar la señalización dependiente de fosfatidilinositol 3 cinasa para promover la invasión del parásito y su sobrevivencia en la célula huésped. Por otro lado, los tripomastigotes expresan varios glicoconjugados de superficie, codificados por familias multigénicas, que han sido implicados en el reconocimiento e invasión, entre las que se incluyen: gp82, gp90 y gp35/50 (Frasch, 2000; Araya *et al.*, 1994). La inducción de transientes de Ca^{2+} en células HeLa o Vero en respuesta a extractos metacíclicos fue atribuido predominantemente a gp82 (Ruiz *et al.*, 1998); en contraste, con niveles de expresión endógena de gp90 y gp35/50 inversamente correlacionada con la habilidad de diferentes cepas de *T. cruzi* para invadir células no fagocíticas (Malaga y Yoshida, 2001).

Como se describió anteriormente son muchas las moléculas que participan en el proceso de reconocimiento y unión del parásito por lo que los avances obtenidos hasta la fecha podrían indicar que la unión del parásito y la invasión no parecen ser el resultado de un proceso de simple unión ligando-receptor. Por el contrario los datos indican que varias moléculas tanto del parásito como de la célula huésped, así como reacciones enzimáticas y un requerimiento energético por parte del parásito, están involucradas en el proceso de reconocimiento. En base a estos resultados se a sugerido que *T. cruzi* puede infectar una diversidad de tipos celulares utilizando diferentes receptores en la célula huésped debido a la carga negativa que presentan éstos en común.

1.1.15 Proceso de invasión de los diferentes estadios de desarrollo del parásito.

Debido a su importancia como uno de los primeros tipos celulares para ser invadidos por *T. cruzi* en infecciones naturales, los macrófagos fueron el principal foco de muchos estudios iniciales de interacciones entre células huésped y tripomastigotes. El mecanismo por el cual los tripomastigotes ingresan a los macrófagos ha sido motivo de controversia, mientras varios investigadores reportan que la entrada es bloqueada en la presencia de inhibidores de la polimerización de actina como citocalacina B (Meirelles *et al.*, 1982; Nogueira, 1976) otros reportan que no han encontrado inhibición y concluyen que la invasión es activada en parte por el parásito (Kipnis *et al.*, 1979), hay estudios que presentan evidencia, de que la invasión de la célula huésped por *T. cruzi* depende más de la habilidad del parásito de reconocer receptores moleculares de la membrana (Cheryl D. y Kuhn R., 1990).

Imágenes de microscopia electrónica de barrido mostraron tripomastigotes entrando a células epiteliales MDCK y fibroblastos 3T3 sin la formación de un pseudópodo o cualquier otra alteración de la membrana plasmática en la célula huésped, en donde la invasión de fibroblastos no fue afectada por la densidad celular, al contrario de lo que sucede con MDCK que son altamente resistentes a la infección apical cuando están polarizadas o confluentes, mostrando que los tripomastigotes entran preferencialmente a través de su superficie basolateral, sugiriendo que la entrada del parásito puede ser influenciada por la polaridad celular (Schenkman *et al.*, 1988).

Ensayos de invasión realizados en presencia de citocalacina D, mostraron que no hubo una inhibición en la entrada del parásito en células HeLa y MDCK, mientras que la entrada de la bacteria intracelular *Salmonella* fue efectivamente inhibida. Por otra parte mostraron que los tripomastigotes activamente penetran células previamente fijadas con aldehído. Para explicar la presencia de una vacuola endocítica, donde el parásito es inicialmente encontrado, los autores sugirieron que además de un proceso activo de unión y penetración que requiere energía del tripomastigote, se requería también la formación de una vacuola en la que participaba la función de la célula blanco (Schenkman *et al.*, 1991).

Otros reportes indican que aún en presencia de citocalacina D se observa una tinción específica de F-actina con faloidina en los sitios de invasión del tripomastigote en células HeLa. Este fenómeno mostró estar acompañado por la extensión de pseudópodos alrededor de los parásitos, un proceso que a sido denominado como “self zippering”, donde la mayor parte de la energía proviene del parásito. Los mismos autores no obtuvieron los mismos resultados en fibroblastos 3T3 o células epiteliales MDCK sugiriendo que esto pudiera estar restringido a células HeLa (Schenkman y Mortara, 1992).

Por otro lado, en células NRK no se pudo observar una acumulación de F-actina alrededor de los tripanosomas recientemente internados, además de que el tratamiento con citocalacina D aumentó la entrada de los tripomastigotes (Tardieux *et al.*, 1992). También, en células MDCK polarizadas (que como se dijo anteriormente, *T. cruzi* invade a través del dominio basolateral y pobremente sobre el dominio apical) cuando fueron tratadas con citocalacina D hubo un aumento en la invasión sobre el dominio apical. Sin embargo es importante considerar que existen reportes en donde han demostrado que el tratamiento de estas células con citocalacina D, inhibe selectivamente la capacidad de las células para llevar a cabo endocitosis de marcadores en la superficie apical, sin afectar la endocitosis en el dominio basolateral (Gottlieb *et al.*, 1993). Esto último pudiera explicar los resultados de Schenkman *et al.*, 1991 y 1992, obtenidos durante la interacción de *T. cruzi* con células MDCK tratadas con citocalacina D.

Por el contrario, el tratamiento con citocalacina B y D de células musculares del corazón HMC no afectó la unión de las formas metacíclicas del parásito a la célula huésped, pero si afecto la invasión del parásito, el cual siempre fue mas bajo en HMC tratadas con citocalacina B y D que en las células control. La inhibición de la infección tuvo un rango de 65 a 75% después de 1 hora y 3 horas de interacción célula-parásito respectivamente. Estos descubrimientos concuerdan con observaciones de expansiones de la membrana celular de HMC durante los estados de adhesión y estados iniciales de interacción de *T. cruzi*, como describieron los mismos autores previamente (Barbosa y Mirelles, 1995).

Experimentos hechos con macrófagos peritoneales de ratón tratados con citocalacina D mostraron un 95% de inhibición en la infección (Zenian y Kierszenbaum, 1983). Apoyando lo anterior, estudios ultra-estructurales hechos en las mismas células mostraron claramente la movilización de componentes del citoesqueleto a la región de internación del parásito, la formación de la membrana “tipo mango” alrededor de los tripomastigotes la cual pudo ser resultado de re-arreglos focales de filamentos de actina en el sitio de entrada del parásito. Además, estos estudios también mostraron que los parásitos fueron incapaces de invadir células fijadas (Barbosa y Mirelles, 1995).

Observaciones usando FITC-faloidina en células Vero, mostraron que en las células analizadas, la polimerización de actina tomo lugar en los sitios de internación del parásito (Carvalho *et al.*, 1999). La incubación en presencia de citocalacina D de células Vero, LLCMK 2, macrófagos y HFSF indujo una marcada inhibición en la internación de tripomastigotes, a pesar de que se observo un marcado incremento en el número de parásitos unidos a la superficie celular. Las imágenes obtenidas no indicaron que se llevara a cabo un proceso fagocítico típico en el sitio donde se encontraba el parásito, porque los autores sugieren que los parásitos también pudieran penetrar por otro proceso el cual no requiere concentración de filamentos de actina alrededor del parásito (Rosestolato *et al.*, 2002; Carvalho *et al.*, 1999).

Resumiendo los resultados anteriores se a propuesto que los tripomastigotes de *T. cruzi* pudiera penetrar a la célula huésped por tres posibles mecanismos: (a) un proceso fagocítico típico, que involucra la formación de proyecciones tipo filopodio y que es dependiente del ensamblaje de filamentos de actina; (b) un proceso endocítico el cual no depende de la formación de extensiones tipo filopodio pero es dependiente del ensamblaje de filamentos de actina para internar al parásito y (c) un proceso endocítico el cual no depende del ensamblaje de los filamentos de actina.

Por otro lado en el caso de amastigotes se ha reportado que éstos son capaces de infectar monocitos y fibroblastos 3T3 *in vitro e in vivo* reportando para ello diferencias en las cinéticas de multiplicación del parásito (ley *et al.*, 1988). Se han podido observar la infección de células HeLa, a causa de la interacción con microvellosidades en la superficie

dorsal de estas células. Esta asociación lleva a una agregación de microvelocidades que puede ser seguida por el englobamiento, el cual es observado por una tinción con faloidina. También, se observó que a diferencia de los tripomastigotes los cuales preferencialmente entran en los márgenes en células HeLa, los amastigotes interactúan con regiones específicas de la superficie celular (Mortara, 1991).

Se ha reportado que los amastigotes son capaces de invadir células HeLa y Vero en un grado mucho mayor que las formas metacíclicas. La invasión de los amastigotes utilizando citocalacina D y Nocodazol fue inhibida por la disrupción de los microfilamentos y microtúbulos, lo que contrasta con el efecto de estas drogas sobre la internación de los tripomastigotes en donde se observó un incremento en la invasión al tratar las células con citocalasina D y una parcial inhibición con necodazol únicamente en células HeLa (Procopio D., 1998; Mortara, 1991). Una posible explicación para esta marcada diferencia puede ser que la invasión de amastigotes a células fagocíticas no profesionales requiere principalmente de rearrreglos de los componentes del citoesqueleto de la célula huésped en un mecanismo “tipo fagocitosis” considerando las dimensiones moderadas del parásito (Allen y Aderem, 1996; Swason y Baer, 1995). Mientras que, los tripomastigotes, que son mucho más grandes y móviles, se ha sugerido que podrían tener un papel mecánico activo en la invasión y que no requerirían un citoesqueleto intacto de la célula huésped como ya ha sido mostrado en algunos reportes. Si los amastigotes tienen una participación activa durante la invasión es algo que aún necesita ser investigado.

Se ha sugerido también que los amastigotes son internados de la periferia celular con una acumulación de actina que es a su vez también una barrera física para la llegada de lisosomas. También se propone que una vez que el paso de internación es concluido, los filamentos de actina se desensamblarían, liberando la vacuola parasitófora para fusionarse a los lisosomas (Procopio *et al.*, 1998). La migración a la región perinuclear del compartimento endocítico temprano podría fusionarse a más lisosomas. Posteriormente los amastigotes escaparían de este compartimento e iniciarían la replicación intracelular (Hall y Joiner, 1993; Hall *et al.*, 1992; Andrews, 1990).

Los resultados anteriores sugieren que los amastigotes extracelulares y tripomastigotes metacíclicos utilizan mecanismos para invadir células huésped con características altamente diferentes para cada estadio del parásito y para cada célula.

Existen diversas variables que son importantes de considerar en la interpretación de los resultados y que posiblemente han influido en la controversia de los resultados obtenidos a la fecha. Por ejemplo, el efecto de la citocalacina B y D que es reversible rápidamente con la remoción de la misma con un simple lavado en el que los parásitos ya adheridos serían rápidamente internados alterando los resultados. También, es importante considerar la dificultad para distinguir los parásitos unidos de los internados, así como el hecho de que la asociación de los parásitos estará determinada por el tratamiento con las drogas y la susceptibilidad a las diferentes líneas celulares utilizadas. De igual manera es importante considerar que las drogas utilizadas para desorganizar el citoesqueleto de la célula huésped pueden estar afectando de manera importante a las moléculas equivalentes en el parásito; siendo este, otro factor que participe en la contradicción de resultados. Todos estos factores juntos, aunado con la variabilidad experimental usada en los diversos trabajos, podrían posiblemente explicar en parte la discrepancia de los resultados hasta ahora obtenidos.

Ya que no ha sido posible inhibir con drogas el movimiento del parásito sin afectar a la célula huésped no ha sido posible a la fecha dilucidar el papel que juega la motilidad del parásito en el proceso de invasión. En el caso de otros parásitos protozoarios tales como *Plasmodium falciparum* y *Toxoplasma gondii* su internación durante el proceso de invasión no depende de la maquinaria dependiente de actina de la célula huésped. En su lugar, ellos utilizan un motor de actinmiosina presente en su propio citoesqueleto para generar la fuerza motil necesaria para impulsarse activamente dentro de la célula huésped (Gruenheid y Finlay, 2003). Es conocido en otros parásitos que éstos presentan una motilidad dirigida ante estímulos quimiotácticos (Franco *et al.*, 1997; Bailey *et al.*, 1985). En el caso de *T. cruzi* no sería extraño que un evento similar sucediera moviendo su flagelo activamente para dirigirse de manera específica y/o direccional ante un estímulo y para participar en su

internación durante el proceso de invasión por lo que futuros estudios son necesarios para dilucidar esto.

1.2 Genes Reporteros

La expresión de genes es un proceso complejo regulado a muchos niveles, cuya etapa limitante es generalmente, la transcripción. Una técnica muy común en el estudio de la actividad transcripcional, es el uso de los llamados genes reporteros que codifican para proteínas fácilmente detectadas. Los genes reporteros son secuencias de ácido nucleico que se utilizan para sustituir o integrarse a otras regiones que codifican para otras proteínas (Proteínas de fusión). Entre ellas está la enzima bioluminiscente luciferasa, cuya actividad genera emisión de fotones que se pueden medir con precisión.

Para investigar la actividad transcripcional de un gen, la secuencia del promotor que regula su expresión se liga a la secuencia que codifica para la enzima. Estas construcciones de ADN son introducidas en las células por medio de plásmidos. Una vez que las células han sido transfectadas, la activación del promotor exógeno inducirá la síntesis de las dos proteínas. Las células se transfectan con un plásmido que contiene la secuencia estructural del gen reportero bajo el control del promotor a estudiar. La transfección puede llevarse a cabo por diversos métodos como son: la electroporación, fosfato de calcio, lipofectamina, microinyección, etc.

Existen otros genes reporteros ampliamente utilizados, entre ellos destaca el gen para b-galactosidasa (b-gal) y más recientemente la proteína verde fluorescente (GFP). El uso de b-gal requiere generalmente la destrucción del tejido por lo que no es posible su utilización en estudios dinámicos. El GFP, por ser fluorescente requiere de iluminación.

1.2.1 Proteína Verde Fluorescente EGFP

La proteína verde fluorescente (Green Fluorescent Protein = GFP) descubierta por Shimomura en 1964, es una proteína que se encuentra en forma natural en la medusa del Pacífico *Aequoria victoria*. Los componentes requeridos para su bioluminiscencia son una fotoproteína activada con Ca^{++} llamada aquarina, la cual emite una luz azul-verde.

La proteína verde fluorescente es extremadamente estable, esta compuesta de un monómero de 27-kDa de 238 aminoácidos. Su fluorescencia natural es ocasionada por un único cromóforo pegado covalentemente que se origina de una secuencia interna Ser-Tyr-Gly (residuos 65, 66 y 67 respectivamente) la cual es modificada después de la traducción por ciclización y oxidación de un p-hidroxibenciliden-imidazolin. El espectro de excitación de la GFP nativa de *A. victoria* (azul) tiene dos picos a 375nm y uno más pequeño a 470nm. Mientras que el espectro de emisión de la fluorescencia (verde) tiene un pico de 509nm. Esta proteína presenta una estructura de un dominio único compacto en donde el cromóforo se encuentra localizado en el centro de la molécula, lo cual le proporciona algunas ventajas, como la resistencia a la desnaturalización con tratamientos de guanidina-HCl 6 M, urea 8 M, SDS al 1% y dos días de tratamiento con varias proteasas tales como: Tripsina, quimiotripsina o papaina a concentraciones de hasta 1 mg/ml. Deleciones en la secuencia de aminoácidos, en particular del residuo más allá de la metionina del extremo N-terminal o más de siete aminoácidos del extremo C-terminal, resultan en la pérdida total de la fluorescencia aún cuando las características del espectro de absorción del cromóforo se encuentren intactas. La GFP puede ser fusionada a otras proteínas tanto a su extremo N-terminal o C-terminal. Este hecho es debido a que ambos extremos de la proteína GFP parecen ser flexibles con respecto a la estructura beta-can, denominada así, por la forma estructural de la proteína la cual presenta 11 pliegues antiparalelos beta en la parte externa formando así un cilindro muy compacto parecido a una lata, por lo que la estructura de la GFP no se distorsiona significativamente por la fusión con otras proteínas (Yang *et al*, 1996).

Una de las aplicaciones más exitosas, es fusionarla con otras proteínas y así monitorear la localización y características de las proteínas de interés utilizando a la GFP como marcador o bandera. La fusión es realizada utilizando la secuencia del gen que codifica para la GFP junto con la secuencia del gen que codifica para la proteína de interés y la quimera resultante se introduce a la célula blanco de forma de que se exprese manteniendo las funciones normales. Por el tamaño y la forma de la GFP, los diferentes pH's así como el potencial redox de los diferentes organelos celulares no parecen ser una barrera importante en la expresión de esta proteína, logrando obtener resultados exitosos al expresar y localizar quimeras con la GFP en núcleo, mitocondrias, vesículas secretoras, retículo endoplásmico, aparato de Golgi, peroxisomas, vacuolas, fagosomas, citoesqueleto y la membrana plasmática permitiendo así su análisis "*in vivo*".

Por otra parte la enorme flexibilidad que tiene como marcador no invasivo en células vivas sirve para otras numerosas aplicaciones tales como, utilizarla como control en experimentos de transfección, monitorear la proteína en células vivas, marcar células para protocolos de separación de células activadas por fluorescencia (FACS), la expresión de genes reporteros y como una medida en el estudio de interacciones proteína-proteína.

Los factores que afectan la expresión o de los cuales depende la detectabilidad de la GFP son los siguientes: Cantidad total de la GFP (número de copias del gen y duración de la expresión), eficiencia de la formación del cromóforo después de la traducción (disponibilidad de los chaperones, tiempo, temperatura, propiedades moleculares de la GFP madura o dimerización, competencia con otras señales de fondo o con autofluorescencia de células o medio de cultivo, calidad de excitación y filtros de emisión), además, la proteína requiere de la presencia de oxígeno para su expresión en las etapas tempranas, particularmente para el deshidrogenado de los enlaces α y β del residuo 66 que se localiza en el cromóforo. Una vez que la proteína ha madurado el oxígeno no tiene efecto (Tsien Y. *et al.*, 1998).

La GFP original ha sido modificada de varias maneras tanto para la optimización de la fluorescencia así como para una mayor expresión y estabilidad en diferentes sistemas

eucariotas. Existen diferentes variantes de la GFP dentro de las cuales esta la llamada Enhanced Green Fluorescent Protein= EGFP. Esta proteína ha sido modificada para optimizar la obtención de una mayor fluorescencia y expresión en células de mamífero (excitación máxima =488 nm, emisión máxima = 507nm). El vector de información pEGFP codifica la variante GFPmut1 que contiene una substitución de doble aminoácido de Phe-64 a Leu y Ser-65 a Thr. El cromóforo de la EGFP tiene una fluorescencia 35 veces más alta que la GFP. Sin embargo la proteína requiere de promotores fuertes para su expresión, tales como el del citomegalovirus (CMV), CV40 y el del VIH, para que la detección sea apreciable y más aún en células de mamífero (Tsien . *et al.*, 1998).

Existen varios métodos por medio de los cuales se puede conseguir la transferencia de genes con una alta eficiencia en células, particularmente de mamífero. Cada una de las técnicas esta asociada a problemas de equipo como la electroporación y la microinyección en comparación con técnicas como la transfección por medio de DEAE-Dextran y la Coprecipitación con fosfato de Calcio, siendo estas últimas técnicas sencillas de realizar y las cuales no requieren de equipo especial y por medio de las cuales se pueden transfectar células eucariotas con ADN genómico de otro origen (Pollad J. *et al.*, 1990).

1.2.2 Proteína Roja Fluorescente DsRed

Dentro de los diferentes homólogos que presentan similitudes con la proteína verde fluorescente y que se vuelven complementarias a esta, se ha descrito a la proteína roja fluorescente, esta proteína fue aislada de la anémona del Indo pacifico *Discosoma striata* donde se presenta de forma natural y en la cual emite un color rojo-naranja fluorescente en su disco oral, esta proteína fue aislada y denominada DsRed.

DsRed esta compuesta por un monómero de 25-kDa de 225 aminoácidos, una característica es que presenta un residuo 69 cercano al fluoróforo de arginina o lisina en lugar de la glutamina en la verde fluorescente. Esta proteína presenta una fluorescencia brillante con una emisión máxima de 583 nm y una absorción máxima de 558 nm, el

espectro de DsRed elimina virtualmente la autofluorescencia que interfiere con la visualización en algunas variantes de la proteína verde (Matz *et al.*, 1999).

Por su potencial de expresión y fusión DsRed atrae un gran interés como herramienta complementaria de los homólogos de GFP. Ahora bien esta proteína se ha mostrado estable en su fluorescencia en cuanto a pH's que van desde 5.0 a 12, aunque la acidificación a pH 4-4.5 decrementa la absorbancia y excitación a 558nm, mientras que el espectro de emisión mantiene la misma forma. (Geoffrey *et al.*, 2000).

Para evaluar la utilidad de esta proteína se examinó en sistemas de expresión eucarióticos donde la fluorescencia se pudo detectar después de dos a tres días de la transfección. Además, la proteína no presentó un efecto tóxico en las células durante la selección de la línea celular estable. Por otro lado en células de *Xenopus* en ensayos de microinyección con EGFP, la señal empezó a decrecer después de la primera semana de desarrollo embrionario mientras que la fluorescencia producida por DsRed se mantenía estable hasta por lo menos la cuarta semana. (Matz *et al.*, 1999).

1.3 La Línea Celular

1.3.1 Fibroblastos 3T3 NIH

Muchas de las células diferenciadas en el cuerpo adulto se pueden agrupar en familias donde sus miembros están relacionados por su origen y sus características. Un ejemplo importante de estas familias son las células de tejido conectivo en el cual sus miembros están relacionados pues presentan un grado inusualmente interconvertible. Esta familia incluye fibroblastos, células de cartílago y células óseas, todas estas están especializadas para la secreción de colágeno en la matriz extracelular y son a su vez responsables de mantener la arquitectura en el cuerpo, así como también las células grasas (adipocitos) y células del músculo liso, las cuales parecen tener un origen común. La interconversión de estos tipos de células se presenta en la figura 9. Las células del tejido conectivo juegan una parte central en el soporte y reparación de cada uno de los tejidos y

órganos, donde su adaptabilidad y carácter de diferenciarse es una característica importante en respuesta a muchos tipos de daño.

Los fibroblastos (Figura 10) parecen ser los menos especializados en la familia del tejido conectivo, están dispersos en todo el cuerpo, en el tejido conectivo, secretando una matriz extracelular no rígida, la cual es rica en colágeno de tipo I y III, cuando los tejidos son dañados los fibroblastos migran hacia el lugar, proliferando y produciendo grandes amontonamientos de colágeno, aislando y reparando el daño del tejido.

Se ha podido observar que los fibroblastos son las células más versátiles del tejido conectivo, mostrando una gran capacidad para diferenciarse a otros miembros de la familia, aunque se ha concebido que pueda existir una mezcla de fibroblastos en el cuerpo, capaces de transformarse a condriocitos, otros capaces de transformarse en adipositos y un tipo de fibroblastos con múltiples capacidades de desarrollo, esto es posible ya que la transformación de fibroblastos maduros provienen de una línea de fibroblastos inmaduros antes llamados células mesenquimales y de los cuales se pueden desarrollar una gran variedad de células maduras (Bruce A., *et al.*, 2003).

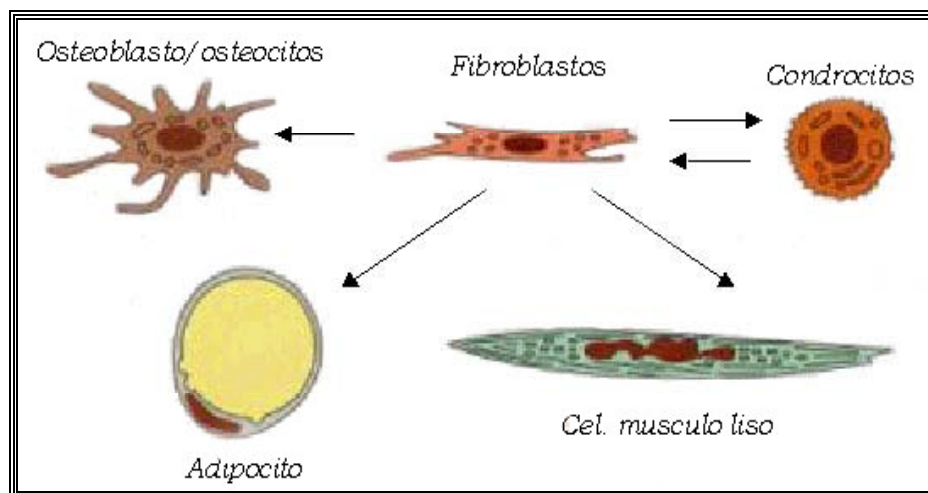


Figura 9. Interconversión que ocurre en la familia de las células de tejido conectivo.

En 1950 Dulbecco y Vogt publicaron el importante papel que tenían los fibroblastos recientemente aislados de animales y cultivados por periodos cortos, pudiéndose

transformar con el virus del polioma. En 1961 George Teodaro para establecer una línea celular inmortalizada en cultivo, utilizo fibroblastos de ratón como blanco para transformación viral, para ello utilizo densidades de inoculación de 3, 6 y 12×10^5 células a intervalos de transferencia de 3 o 6 días, después de un periodo observo que el crecimiento declinaba después de 10 a 20 generaciones de la célula, periodo en el cual el tiempo en el que se doblaba el número de fibroblastos aumento casi a 100 horas, posterior a esto la tarifa de crecimiento aumento en 9 de 11 cultivos desarrollados bajo las mismas condiciones, estas líneas celulares se desarrollaron doblando el número de fibroblastos en tiempos de 15 a 24 horas. Una vez que tuvieron inmortalizadas las células, se pudo observar que la característica de cada línea dependía de la densidad de el inoculo, así como del intervalo de la transferencia. La línea que emergió con la cantidad de inoculo más alta (3T12) y creo un subcultivo cada tres días tuvo la cantidad más alta de saturación, las células que crearon un subcultivo con la mitad de inoculo dieron lugar a una línea (3T6) con una más baja cantidad de saturación. La línea más interesante origino un subcultivo serial, para ella se utilizo el inoculo más pequeño. Esta línea 3T3 creció tanto como las otras líneas mientras las células eran escasas, a diferencia de que arrestaron su crecimiento agudamente incorporando un estado de reclinación estable cuando las células llegaban a ser confluentes y que al ser transferidas por dilución reasumían su crecimiento exponencial alcanzando una vez más su densidad de saturación, demostrando de esta manera que los fibroblastos mantenidos a densidades de población baja durante el periodo de inmortalización se desarrollan en una línea celular, la cual se puede llevar a confluyente entrando a un estado reversible de reclinación en una densidad baja (Todaro y Green, 1963).

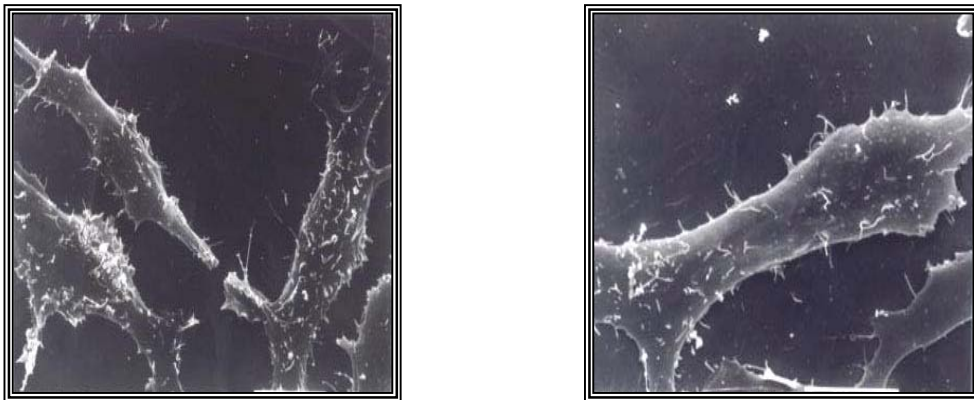


Figura 10. Cultivo de fibroblastos 3T3 NIH.



2) Justificación

Aún cuando el mecanismo de infección de *Trypanosoma cruzi* se conoce desde hace varios años, diversos aspectos moleculares y celulares del proceso de infección son desconocidos y otros se encuentran en controversia. Los resultados hasta la fecha descritos parten de evidencias obtenidas de forma indirecta en donde utilizan drogas que dificultan la interpretación de los mismos. Se ha sugerido que los amastigotes y tripomastigotes infectan a la célula huésped con diferente capacidad en donde utilizan distintos mecanismos de infección, siendo a la fecha poco el avance en este campo de la investigación por diversas limitantes, entre las que se encuentra la dificultad de visualizar al parásito dentro de la célula huésped. En un trabajo previo se obtuvieron parásitos *Knock-in* que expresan de manera estable las proteínas fluorescentes EGFP y DsRed1-1. Estos parásitos transfectados son fácilmente distinguibles bajo microscopía de fluorescencia lo que permite realizar diferentes experimentos *in vivo*, con estos parásitos nos propusimos evaluar el proceso de infección de los diferentes estadios de desarrollo de *T. cruzi*.

3) Objetivos

Evaluar el proceso de infección de los diferentes estadios de *Trypanosoma cruzi* utilizando moléculas fluorescentes.

3.1 Objetivos Particulares

- 1.- Obtener clonas de epimastigotes de *T. cruzi* a partir de poblaciones transfectadas de manera estable con DNA del plásmido pTREXn-EGFP y pTREXn-DsRed1-1.
- 2.- Realizar curvas de crecimiento de las clonas obtenidas.
- 3.- Determinar la estabilidad de la fluorescencia de los parásitos expresando las proteínas EGFP y DsRed a diferentes pH's.
- 4.- Determinación de las mejores condiciones de transformación *in vitro* de los parásitos.
- 5.- Realizar infecciones primarias con epimastigotes de *T. cruzi* expresando las proteínas EGFP y DsRed en fibroblastos 3T3 NIH.
- 6.- Obtener y purificar tripomastigotes y amastigotes de *T. cruzi* expresando las proteínas EGFP y DsRed de los sobrenadantes de infecciones primarias.
- 7.- Determinar las cinéticas de infección secundaria de los tres estadios de desarrollo de *T. cruzi* en fibroblastos 3T3 NIH.

4) Material y Métodos

4.1 Material Biológico

4.1.1 Células Huésped

Se utilizaron fibroblastos 3T3 NIH

4.1.1.1 Cultivo de Fibroblastos 3T3 NIH

Las células se resembraron a una razón de pase de 1:10 en un frasco de cultivo T-25, con 5ml de Medio DMEM (Dulbecco's modified Eagle Medium, GIBCO) alta glucosa complementado con 10% suero fetal bovino (SFB), 0.5% de ampicilina/estreptomicina a 37°C en presencia de CO₂ al 5%. Para llevar a cabo la resiembra una caja confluyente a la que se retira el medio, se le adicionan 3ml de PBS 1x EDTA 0.53M para lavar la monocapa. Se le agrega 1.5ml de Tripsina-EDTA por 10 min a 37°C. Se agita ligeramente para desprender las células y se coloca la suspensión celular en un tubo *falcón* con 5ml de medio DMEM alta glucosa fresco sin complementar. Se centrifuga a 1800 rpm a 20° C para retirar la tripsina de las células. Se desecha el sobrenadante y la pastilla se resuspende en 1ml de medio DMEM alta glucosa complementado con 10% SFB y 0.5% ampicilina/estreptomicina. Se toma 100µl y se colocan en la caja con el medio nuevo. Esta caja se deja en la incubadora a 37°C y una atmósfera de CO₂ al 5% dejando semiabierta la tapa y se espera a que vire el medio, indicando la estabilización del pH (7.2) del medio. Se cierra la tapa y se continúa la incubación hasta obtener la confluencia deseada.

4.1.2 Parásitos

Los parásitos utilizados fueron epimastigotes de *Trypanosoma cruzi* cepa CL Brener transfectados de manera estable con ADN del plásmido pTREXn-EGFP y pTREXn-

DsRed1-1 obtenidos en el laboratorio y de los cuales se seleccionaron clonas mediante la técnica de dilución limitante.

4.1.2.1 Obtención de clona de parásitos

De los parásitos transfectados resistentes al antibiótico de selección (250 μ g/ml de G418) en fase de crecimiento logarítmica se realizaron diluciones dobles seriadas hasta obtener una concentración de 7 parásitos/100 μ l, utilizando para su conteo una cámara de Neubauer. Se sembraron los parásitos en cajas de 96 pozos colocando 100 μ l de medio LIT complementado (10% de suero fetal bovino (SFB), 1% penicilina/estreptomicina y 1% de hemina) en cada pozo.

El inóculo inicial fue la adición de 7 parásitos/100 μ l/pozo en la primera fila, mezclando con el medio previamente colocado y se realizaron diluciones dobles seriadas, hasta obtener 1 parásito/pozo. Verificando su presencia con la ayuda del microscopio de fluorescencia. Las placas de cultivo se mantuvieron en una cámara húmeda a 28°C, durante 14 días monitoreando el crecimiento de parásitos por microscopia de fluorescencia. Trascurrido este tiempo se seleccionaron aquellos pozos en donde existía una colonia de parásitos. Las colonias observadas se retiraron de la placa y se expandieron cultivándolas en 10ml de medio LIT complementado, a 28°C en tubos *falcón* de 15ml, manteniéndolas en fase de crecimiento logarítmica, para lo cual se contaron los parásitos y se resembraron constantemente hasta obtener colonias más grandes en cuanto al número de parásitos de cada clona obtenida.

4.1.2.2 Cultivo de parásitos

Parásitos *wild type* (WT) y las clonas obtenidas a partir de los parásitos transfectados con pTREXn-EGFP y pTREXn-DsRed1-1, a los que nos referiremos en adelante como EGFP y DsRed respectivamente, se cultivaron en 5ml de medio LIT complementado, en tubos *falcón* de 15ml, a 28°C, utilizando un inóculo de 0.5ml de un cultivo en fase logarítmica. En estas condiciones los parásitos se resembraron periódicamente manteniendo los stock mensualmente y los cultivos para uso experimental semanalmente.

4.1.2.3 Curvas de crecimiento

Obtenidas las clonas y en fase de crecimiento logarítmica se realizaron curvas de crecimiento celular para ambos tipos de parásitos transfectados, tomando como control la cepa WT, para ello se colocaron epimastigotes de *T. cruzi* WT, EGFP y DsRed en tubos *falcón* de 15ml a un inóculo inicial de 1×10^6 parásitos/ml en medio LIT complementado. Los parásitos se contaron cada 24 horas con la ayuda de una cámara de Neubauer.

4.2 Expresión de la Proteína EGFP y DsRed en Epimastigotes Transfectados con los Plásmidos pTREXn EGFP y pTREXn DsRed1-1 Cultivados a Diferentes pH

Una vez obtenidas colonias a partir de las clonas, se evaluó la expresión de la fluorescencia de los epimastigotes de *T. cruzi* EGFP y DsRed a diferentes pH's, para ello se preparo solución PBS 1xEDTA 0.53M y se ajusto el pH con HCl 1N o NaOH 1N en los siguientes rangos:

pH	5.0	pH	6.2	pH	7.2	pH	8.2	pH	9.2
pH	5.2	pH	6.5	pH	7.5	pH	8.5	pH	9.5
pH	5.5	pH	6.8	pH	7.8	pH	8.8	pH	9.8
pH	5.8	pH	7.0	pH	8.0	pH	9.0	pH	10
pH	6.0								

Obtenidas las series de soluciones a diferentes pH's se tomo una placa de cultivo celular 96 pozos y se colocaron 100µl de cada solución por pozo. Se tomaron 21 alícuotas con un inóculo de parásitos de 5×10^6 parásitos/200µl, los parásitos se lavaron en PBS 1xEDTA 0.53M centrifugando a 5000 rpm/5 min dos veces, separando los restos de cultivo LIT. Posteriormente la pastilla de cada tubo se resuspendió en 200µl de PBS 1xEDTA 0.53M con pH creciente a partir de pH 5.0 hasta pH 10, tanto para parásitos verdes como para rojos. Colocados los parásitos en los diferentes pH's se centrifugaron a 5000 rpm/5 min resuspendiendo en 200µl PBS 1xEDTA 0.53M a igual pH y se realizo una segunda centrifugación, la pastilla se resuspendió en 100µl de PBS del mismo pH y se adiciono al

pozo de cultivo correspondiente, manteniéndose a 28°C. Colocados los epimastigotes se monitorearon bajo microscopio de fluorescencia identificándose el número de parásitos móviles y la intensidad de la expresión de la fluorescencia observando las variaciones de la expresión de la proteína en los diferentes pH's.

4.3 Transformación *in vitro* de epimastigotes de *T. cruzi*

Se utilizaron epimastigotes de *T. cruzi* WT, EGFP y DsRed en fase de crecimiento logarítmica crecidos en medio LIT complementado a 28° C. El inóculo utilizado fue de 1×10^6 parásitos/ml.

4.3.1 Medio

El medio utilizado fue DMEM alta glucosa. Utilizando cuatro variables:

- A) Control (infecciones primarias). Para esta variable se cultivaron previamente fibroblastos 3T3 NIH en medio DMEM alta glucosa complementado 10% SFB, a 37°C, 5% CO₂. Al observarse una monocapa confluyente se realizaron los mismos pasos para la resiembra y la pastilla se resuspendió en 1ml de medio, de este paquete se tomaron 30-35µl y se colocaron con 1ml de medio DMEM complementado 10% SFB por pozo en 6 pozos de una placa de cultivo celular (24 pozos) manteniéndose a 37°C, 5% CO₂, hasta observarse una monocapa del 70–80%, momento en el cual se reemplazo el medio por DMEM complementado al 2% SFB, manteniendo un pH de 7.2.
- B) Medio fresco DMEM complementado al 2% SFB, pH 7.2
- C) Medio condicionado de cultivo celular infectado con epimastigotes de *T. cruzi* 46 horas. Monocapas de fibroblastos 3T3 NIH crecidas en DMEM complementado 10% SFB y cultivadas a 37°C, 5% CO₂ a una

confluencia del 70-80% se les reemplazo el medio por DMEM complementado al 2% SFB y se infectaron con 1×10^7 epimastigotes/ml en fase de crecimiento logarítmica previamente lavados y resuspendidos en medio DMEM sin complementar. Una vez infectadas la monocapa se mantuvo a 37°C , 5% CO_2 durante 48 horas. Posteriormente se recupero el medio y se centrifugo a 5000 rpm/5 min separando parásitos y restos celulares, el pH se mantuvo de 6.8. El medio se conservó a 4°C .

- D) Medio condicionado de cultivo celular 96 horas. Se cultivaron fibroblastos 3T3 NIH en medio DMEM complementado 10% SFB durante 96 horas a 37°C , 5% CO_2 , tiempo en el cual se observo una monocapa de células confluentes y se pudo observar un cambio en el color del medio, claramente identificado (naranja-amarillo) con pH de 6.0. El medio se recupero y se centrifugo a 1800 rpm/5 min. Conservándose a 4°C .

Una vez alcanzada la confluencia del cultivo celular cultivado en la placa de 24 pozos y cambiado el medio por medio fresco, se plaquearon los medios obtenidos en los pozos restantes (1ml de medio por pozo en 6 pozos) y se coloco a 37°C , obtenidas estas condiciones se llevo a cabo la adición del parásito por duplicado, realizándose de la siguiente forma: se tomaron 8 alícuotas con 1×10^6 parásitos/ml de parásitos WT, EGFP y DsRed y se centrifugaron a 5000 rpm/5 min separando el medio LIT, el paquete celular se resuspendió en 1ml de medio DMEM sin complementar y se centrifugo en las mismas condiciones, resuspendiendo en 1ml de medio a cultivar, realizándose este paso por duplicado, obtenido el paquete celular se resuspendió en $100\mu\text{l}$ del mismo medio y se adicione a sus respectivos pozos. Los cultivos se mantuvieron a 37°C , 5% CO_2 monitoreándose y contando las diferentes formas de parásitos cada 24 horas.

4.4 Infección de fibroblastos 3T3 NIH con *Trypanosoma cruzi*

4.4.1 Infección primaria

Esta primera infección se hace con el propósito de obtener parásitos en sus fases de amastigote y tripomastigote.

La infección primaria de fibroblastos 3T3 NIH se realizó en cajas con una monocapa de células al 70%, crecidas en frascos T-25 con 5ml de medio DMEM alta glucosa complementado con 10% SFB, 0.5% ampicilina/estreptomicina. La infección de estas células se realizó con parásitos en fase de crecimiento logarítmica a una densidad de 1×10^7 epimastigotes (previamente lavados con medio DMEM alta glucosa sin complementar para eliminar el medio LIT remanente) en medio DMEM alta glucosa complementado con 2% de SFB y 0.5% de ampicilina/estreptomicina a 37°C en presencia de CO₂ al 5%. Después de 48 horas se lavaron las cajas de cultivo con 2ml de medio DMEM alta glucosa a 37°C sin complementar, hasta eliminar los parásitos remanentes en el sobrenadante, posteriormente se agregó 5ml de medio fresco complementado (DMEM alta glucosa complementado con 2% de SFB y 0.5% de ampicilina/estreptomicina) cambiándose cada tercer día y monitoreando diariamente el progreso de la infección bajo el microscopio de fluorescencia.

4.5) Purificación de tripomastigotes y amastigotes

Una vez que se observaron tripomastigotes y amastigotes en el sobrenadante de las células infectadas se retiró el sobrenadante. El medio de cultivo se colocó en un tubo *falcón* 15ml y se centrifugó a 1800 rpm/5 min, para separar el debris celular. Se recuperó el sobrenadante y se centrifugó a 5000 rpm/5min para coleccionar los parásitos. Terminada la centrifugación se desechó el sobrenadante, procurando dejar cerca de 500µl en el cual se resuspendió la pastilla y se pasó a un tubo *ependorf* de 1.5ml centrifugando a 5000 rpm/5 min. Al término de esta centrifugación se desechó el sobrenadante y se adicionó un volumen aproximado de 4 ó 5 veces el tamaño de la pastilla de anticuerpo 2c2 B6 αssp4

que reconoce un antígeno de superficie de amastigotes, se centrifugo a 5000 rpm/5 min posteriormente se desecho el sobrenadante y la pastilla se resuspendió en igual cantidad de anticuerpo. Se incubo a 37° C por 1 hora y después se centrifugo por 5-6 seg. Se retiro el sobrenadante y se coloco en otro tubo (aquí se encontraron suspendidos los tripomastigotes con no mas del 10% de amastigotes contaminantes), la pastilla obtenida con el anticuerpo se lavo con medio DMEM y se resuspendió con medio nuevo. Al igual que el sobrenadante conteniendo los tripomastigotes, la suspensión de amastigotes no contenía más del 10% de tripomastigotes contaminantes. Se contaron los diferentes estadios de desarrollo de los parásitos purificados en una cámara de Neubauer.

4.6 Infección secundaria con diferentes estadios de *T. cruzi* (epimastigotes, tripomastigotes y amastigotes)

Células 3T3 NIH a un 70% de confluencia crecidas en placas de 24 pozos fueron infectadas con los diferentes estadios de desarrollo del parásito previamente purificados como se mencionó anteriormente. La infección se llevó a cabo de la misma manera que las infecciones primarias con las siguientes variaciones: Para cada estadio se utilizaron 2×10^6 y 1×10^5 parásitos/250 μ l/pozo incubando a 37° C por 2 horas. Los experimentos fueron hechos por triplicado para cada estadio. Al término de las 2 horas de incubación, los cultivos se lavaron con medio DMEM sin complementar a 37° C hasta eliminar los parásitos remanentes. El progreso de la infección se monitoreo diariamente bajo el microscopio de fluorescencia, llevando un registro del número de células infectadas por pozo, número de parásitos intracelulares en división y número de parásitos en sobrenadante.

4.7 Montaje de laminillas.

Se sembraron fibroblastos 3T3 NIH en cubreobjetos de 5x5mm contenidos en cajas de petri de 35x10 mm, estas células se infectaron con las mismas condiciones utilizadas en infección secundaria. Los cubreobjetos se retiraron en los mismos tiempos. Para su fijación se lavaron en PBS 1x a 37° C, 2 veces y se colocaron en PBS-formaldehído 4% temperatura ambiente, durante 20 min, después se lavaron con PBS 1x a temperatura ambiente y se montaron en portaobjetos con 5 μ l de airvol manteniéndose a 4° C. Las

imágenes se procesaron en un microscopio de epifluorescencia ZEISS y se tomaron con ayuda del Software Twin Viewfinder, versión 3.0 y fueron procesadas con el Software Image-Pro Plus, versión 4.0.

5) Resultados

Se obtuvieron clonas para cada uno de los parásitos transfectados fluorescentes a partir de poblaciones resistentes al antibiótico de selección (Figura 11 y 12) Para epimastigotes transfectados con ADN del plásmido pTREXn-EGFP (denominados como EGFP) se pudieron aislar y expandir 5 diferentes clonas (C1, C2, C3, C4 y C5) observando que la expresión de la proteína en todas las clonas obtenidas era homogénea presentando una fluorescencia verde intensa vista bajo el microscopio de fluorescencia (Figura 13 panel **a** y **b**). Por otro lado se obtuvieron clonas de epimastigotes transfectados con ADN del plásmido pTREXn-DsRed1-1 (denominados como DsRed) logrando aislar y expandir 3 clonas (C1, C2 y C3) en donde la expresión de la proteína en las clonas aisladas fue homogénea, en cuanto a la intensidad de esta, vista bajo el microscopio de fluorescencia se observo que solo dos clonas presentaban una fluorescencia roja intensa, mientras que la tercera presento una fluorescencia roja tenue (Figura 14 panel **a** y **b**).

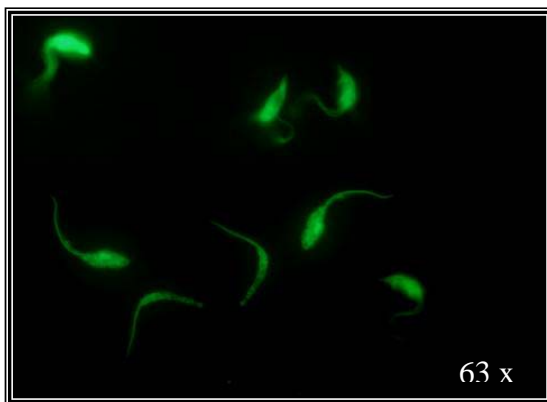


Figura 11.- Población de epimastigotes transfectados con la secuencia que codifica para EGFP

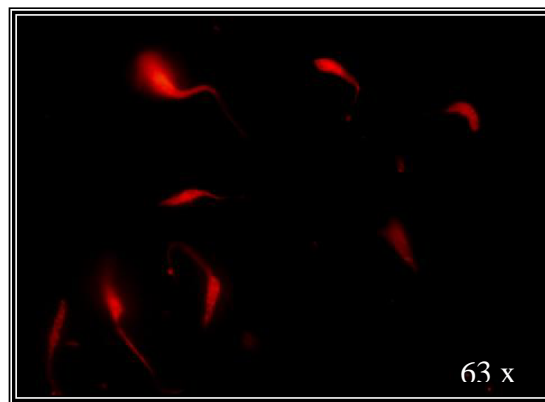


Figura 12.- Población de epimastigotes transfectados con la secuencia que codifica para DsRed1-1.

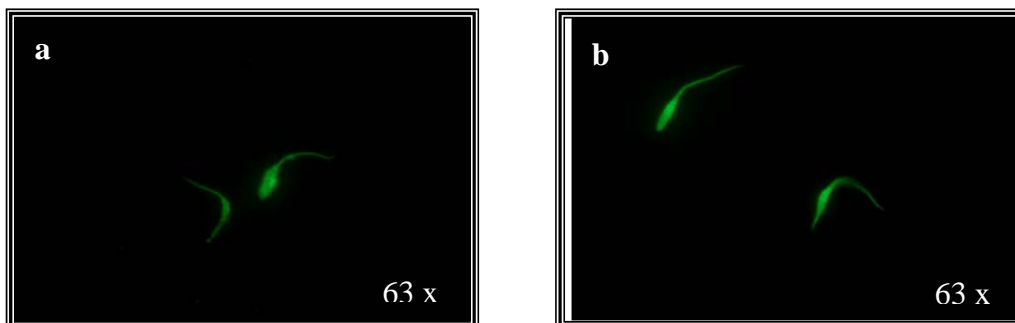


Figura 13.- Clonas de epimastigotes obtenidas a partir de poblaciones resistentes al antibiótico de selección. **a** y **b**, clonas obtenidas de epimastigotes verdes fluorescentes expresando la proteína de manera homogénea e intensa.

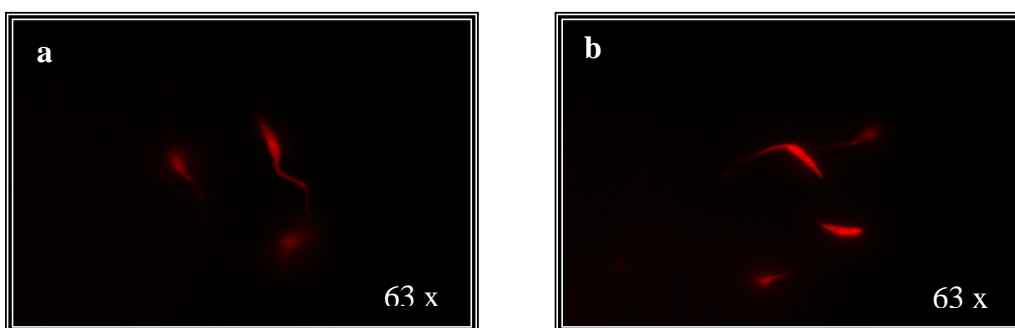


Figura 14.- Clonas de epimastigotes obtenidas a partir de poblaciones resistentes al antibiótico de selección. **a** y **b**, clonas obtenidas de epimastigotes rojos fluorescentes, en **a** la expresión de la proteína presenta menor intensidad, mientras que **b** se observa de manera más intensa.

Una vez expandidas y mantenidas en fase logarítmica durante varios pases, se evaluaron las curvas de crecimiento de los parásitos clonados expresando las proteínas fluorescentes y se compararon con los parásitos *wild type* (WT). Los resultados mostraron que no hay diferencias en su crecimiento (tabla 1, figura 15).

Días de cultivo

Parásitos	0	1	2	3	4	5	6	7	8
WT	1	4.18	8.25	13.88	20.3	31.2	45	72	58
EGFP	1	4.06	10.5	13.25	22.7	34.6	50	75	50
DsRed	1	4.1	6.75	10.56	18.3	30.9	46.25	74	42

Tabla 1. Número de epimastigotes en fase de crecimiento logarítmica obtenidos a partir de un inoculo de 1×10^6 parásitos/ml, cultivados en medio LIT, contados cada 24 horas durante 8 días. WT, EGFP y DsRed.

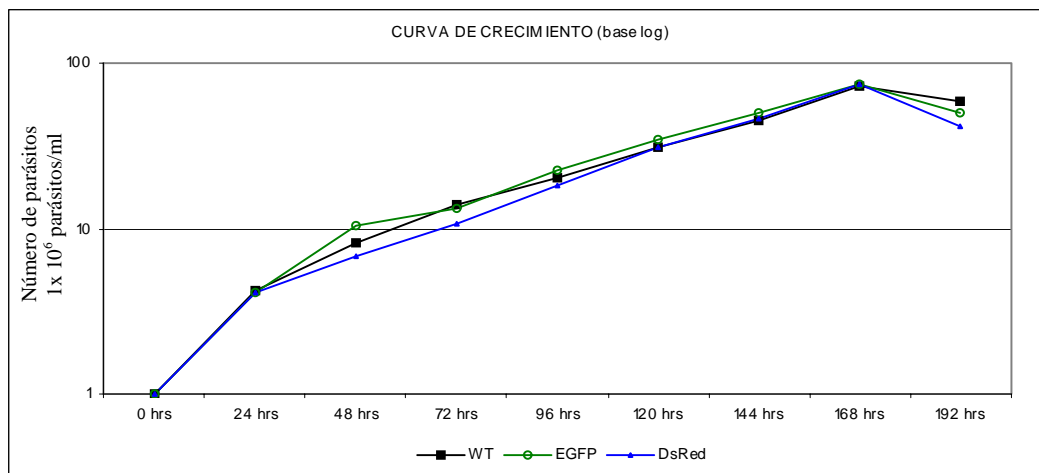


Figura 15. Curva de crecimiento de epimastigotes WT, EGFP y DsRed.

Como se mencionó en los antecedentes se ha reportado que las proteínas fluorescentes son estables en un amplio rango de pH. Considerando que nuestros parásitos estarán expuestos dentro de la vacuola parasitófora a pH ácidos, decidimos evaluar la fluorescencia de éstos a diferentes pH's. Los resultados mostraron que la expresión de la proteína se mantiene estable en los distintos pH's (dato no mostrado), además observamos que la viabilidad de los mismos decrece con el tiempo de exposición al PBS en un rango de pH de 5 a 10 (Figura 16 a y b).

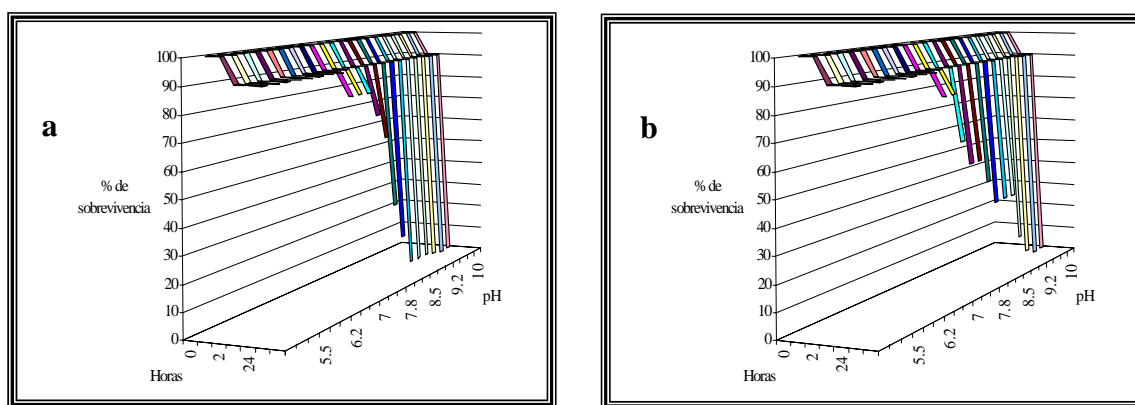


Figura 16. Epimastigotes expresando la proteína fluorescente EGFP (a) y DsRed (b) expuestos a pH's en un rango de 5 a 10, monitoreados bajo microscopía de fluorescencia, el valor indica el % de parásitos vivos. Los resultados son el promedio de 2 experimentos independientes.

En nuestros resultados observamos que los parásitos se mantienen viables dentro de las primeras 3 horas tanto para parásitos expresando la proteína EGFP como DsRed. Posterior a este tiempo la cantidad de parásitos viables decreció en cuanto más básico se

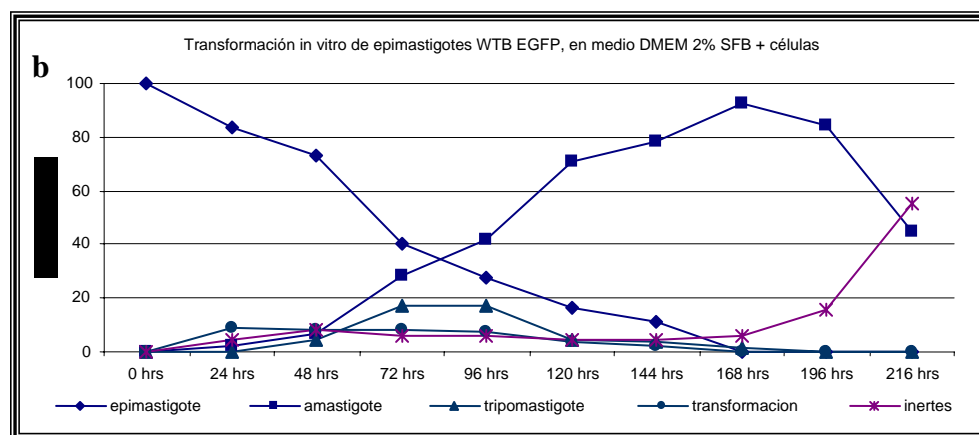
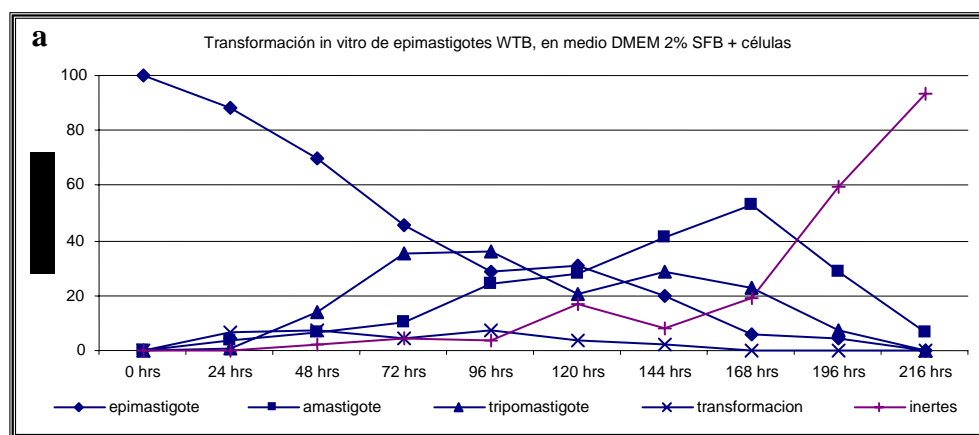
tornó el medio y a mayor tiempo de exposición. En cuanto a la expresión de la proteína fluorescente, esta se observó constante aún cuando los parásitos habían muerto, así mismo la diferencia de pH en los rangos probados no modificó o alteró la expresión de ambas proteínas (dato no mostrado).

Como una alternativa para la obtención de los estadios de desarrollo de *T. cruzi* se realizaron transformaciones *in vitro* de epimastigotes al estadio de amastigote extracelular (AE) y tripomastigote, para ello como primer paso se estandarizaron las condiciones en las que se observó que hay una transformación a estos estadios. Las figuras 17-20 nos muestran la transformación *in vitro* de epimastigotes (rombo) a los estadios de amastigote (cuadro) y tripomastigote (triángulo).

En todos los casos observados de transformación con los diferentes tipos de medios y parásitos (figuras 17-20 **a**, **b** y **c**) se observó una clara transformación al estadio de AE, los parásitos WT y EGFP presentaron una transformación a partir de las 48 horas, mientras que DsRed presentó una transformación observable desde las primeras 24 horas. Con esto podemos apreciar en las mismas gráficas que los niveles más altos de AE se presentaron para DsRed 24-48 horas antes que los niveles más elevados obtenidos con WT y EGFP. En estas gráficas podemos observar que se lograron obtener AE en forma gradual, esto a medida que disminuían los epimastigotes. De igual forma se lograron obtener tripomastigotes desde las primeras 24 horas observando que estos no se mantienen constantes y que varían de acuerdo al tipo de medio y parásito. En todos los casos (a excepción de 20 **a**) se pudieron observar pequeños picos de tripomastigotes en las primeras 48-72 horas disminuyendo después de estos tiempos. También a partir de las 168 horas se empezó a detectar muerte de parásitos y que a las 216 horas representan la mayoría de ellos. Esto último es esperado ya que en condiciones normales durante la infección requerimos de cambiar el medio cada 48 horas para mantener las condiciones de nutrientes y pH adecuadas; sin embargo, en esta serie de experimentos no es posible hacer este cambio por lo que suponemos que la muerte posiblemente es resultado de la acidificación del medio a juzgar por el color amarillo del mismo.

Transformación *in vitro* de epimastigotes WT (a), EGFP (b) y DsRed (c), en placas de cultivo celular con monocapas de fibroblastos 3T3 NIH a una confluencia del 70% mantenidas en medio DMEM alta glucosa fresco, complementado al 2% SFB cultivados a 37°C (Figura 17)

Como control se utilizaron infecciones primarias en las que ya tenemos establecidas condiciones que permiten obtener infecciones productivas. En estas condiciones de medio se observó que los AE obtenidos a partir de parásitos WT fue del 53% y los tripomastigotes del 34% (Figura 17 a), los parásitos obtenidos a partir de EGFP y DsRed fueron mayores al 80% para AE y para tripomastigotes del 15 y 35% respectivamente. (Figura 17 b y c).



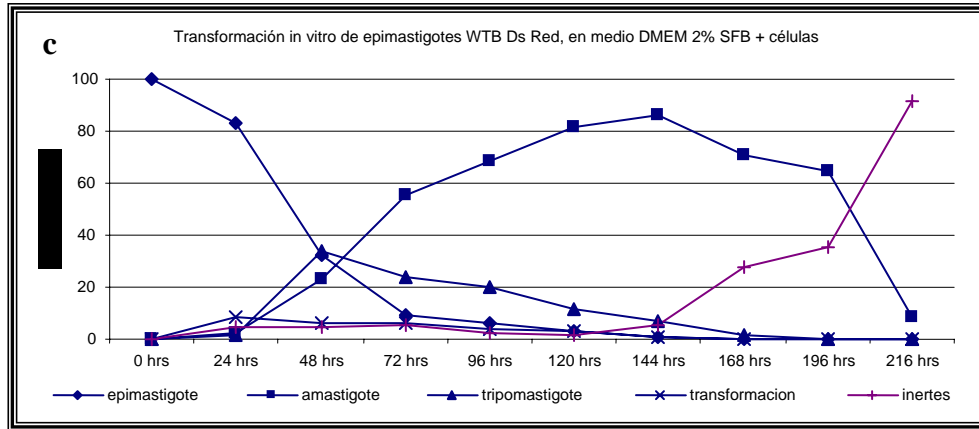
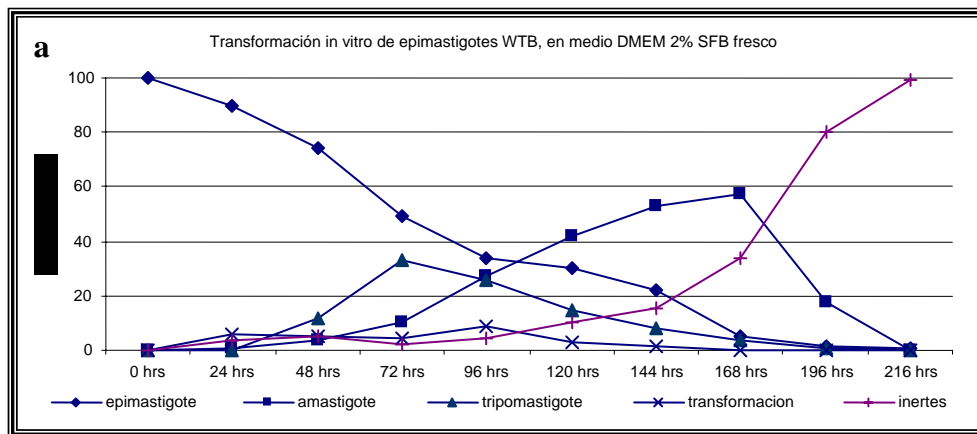


Figura 17. Transformación de epimastigotes WT (a), EGFP (b) y DsRed (c) en medio DMEM fresco complementado al 2% SFB + cultivo celular. Los resultados son el promedio de 4 experimentos independientes.

Transformación *in vitro* de epimastigotes WT (a), EGFP (b) y DsRed (c) en placas de cultivo celular con medio DMEM alta glucosa fresco, complementado al 2% SFB a 37° C (Figura 18)

Los resultados en estas condiciones de medio muestran que los AE obtenidos a partir de parásitos WT fueron del 58% y los tripomastigotes del 33% (Figura 18 a). Por otro lado en el caso de parásitos EGFP Y DsRed se alcanzaron niveles de transformación del 80 % para AE y 10 y 25 % respectivamente para tripomastigotes (Figura 18 b y c). En todos los casos predomina la presencia de AE con respecto a tripomastigotes.



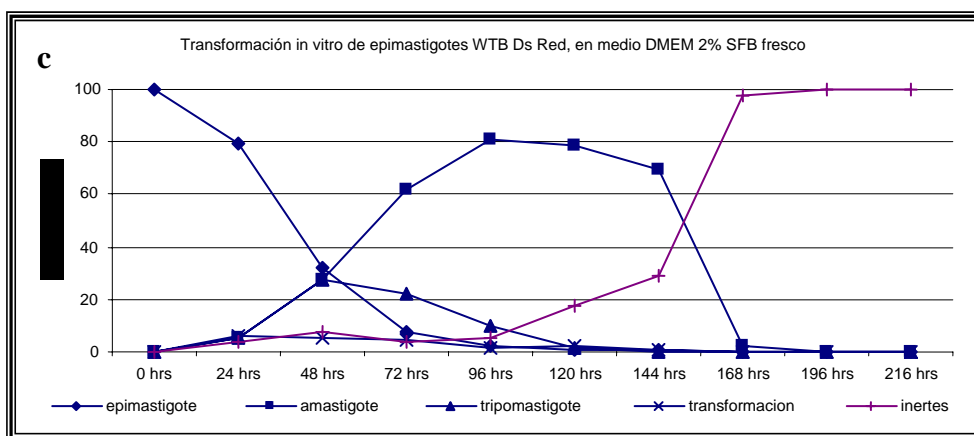
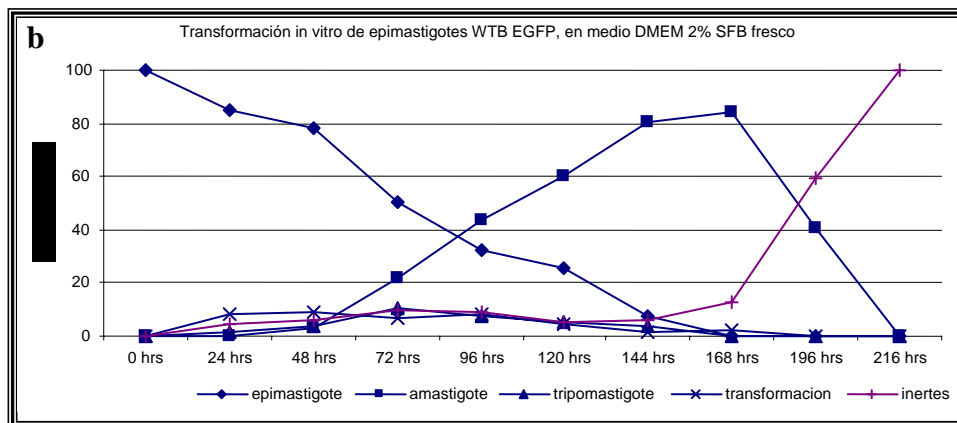


Figura 18. Transformación de epimastigotes WT (a), EGFP (b) y DsRed (c) en medio DMEM fresco complementado al 2% SFB. Los resultados son el promedio de 4 experimentos independientes.

Transformación *in vitro* de epimastigotes en medio DMEM alta glucosa condicionado, obtenido a partir de células 3T3 NIH infectadas con epimastigotes, mantenidas con DMEM complementado al 2% SFB a 37°C durante 48 horas (Figura 19)

En este medio se observó que los AE obtenidos a partir de parásitos WT fueron del 39% y la de tripomastigotes del 12% (Figura 19 a), con los parásitos EGFP y DsRed se obtuvo el 80% de AE y de tripomastigotes fueron del 13 y 18% respectivamente (Figura 19 b y c).

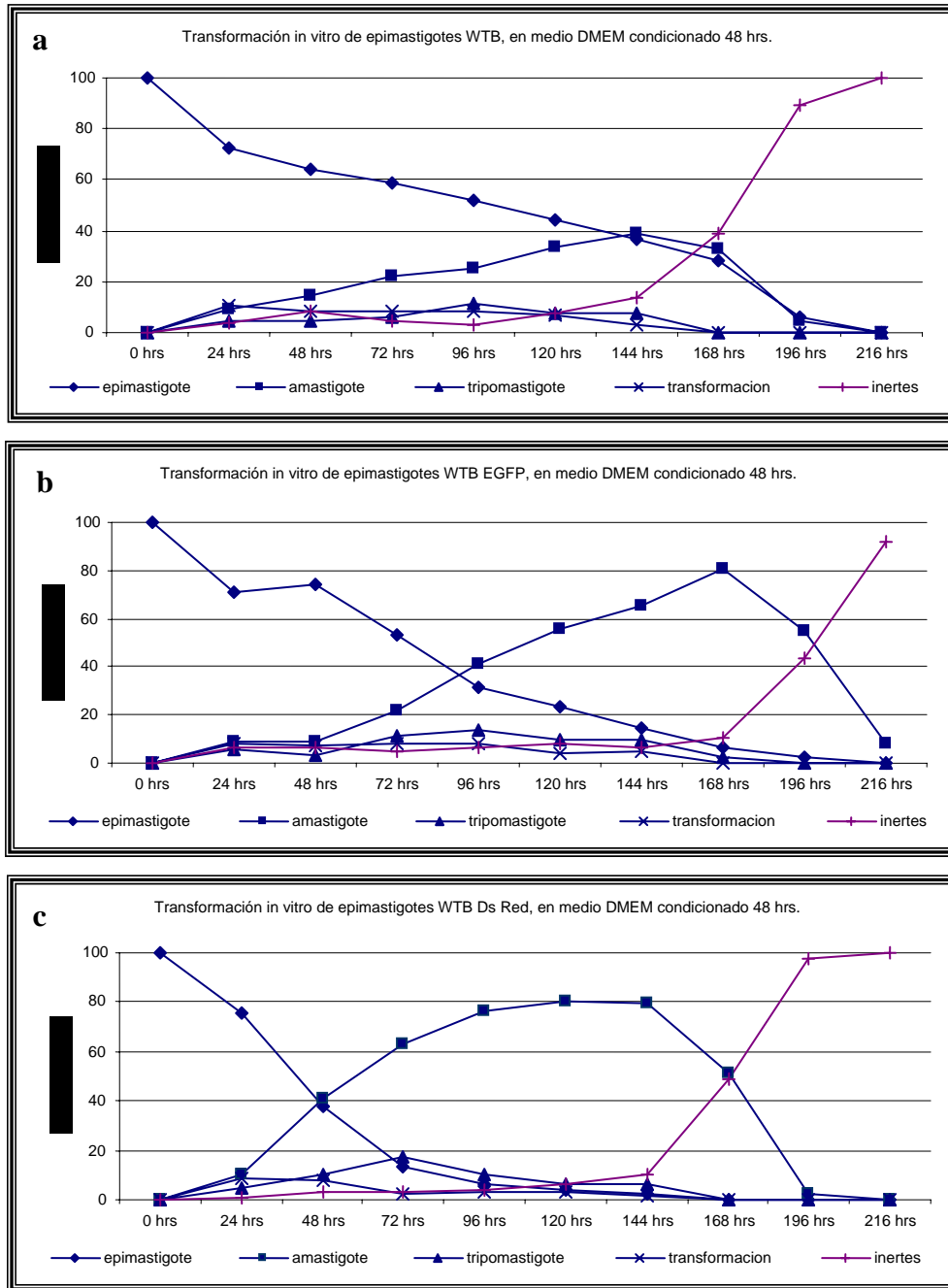
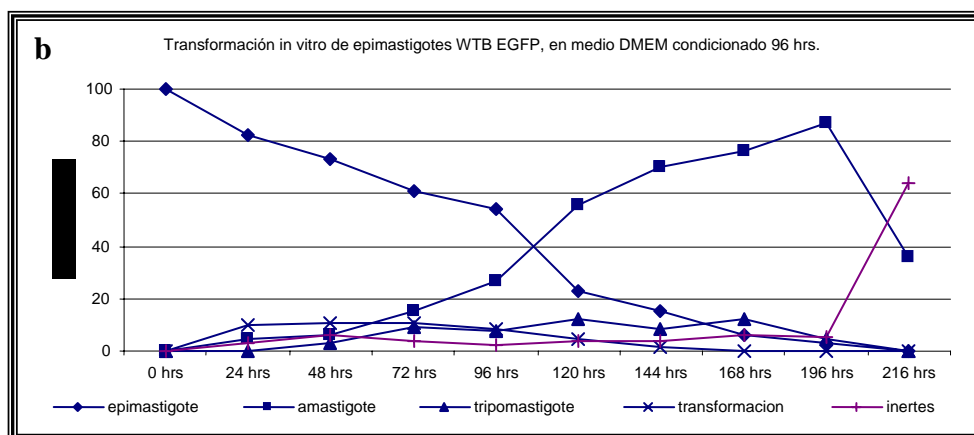
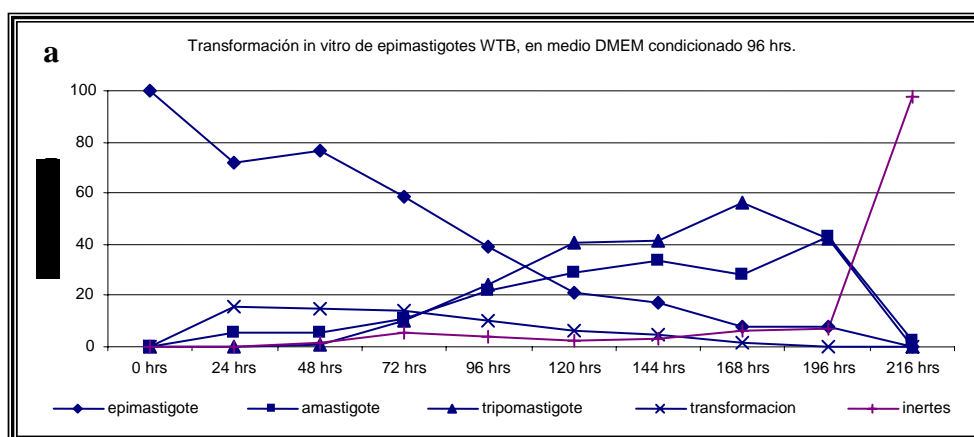


Figura 19. Transformación de epimastigotes WT (a), EGFP (b) y DsRed (c) en medio DMEM condicionado a 48 hrs. Los resultados son el promedio de 4 experimentos independientes.

Transformación *in vitro* de epimastigotes en placas de cultivo celular con medio DMEM alta glucosa condicionado, obtenido a partir de monocapas de células 3T3 NIH confluentes crecidas en medio DMEM complementado al 10 % SFB a 37° C mantenidas durante 96 horas (Figura 20)

En estas condiciones se observó que los AE obtenidos a partir de parásitos WT fue menor a la observada con los medios anteriores (43%) y contrario a lo ya observado, los tripomastigotes obtenidos fueron del 56% (Figura 20 a). Con los parásitos EGFP y DsRed se obtuvo el 80% de AE mientras que los tripomastigotes observados fueron de 12 y 24% respectivamente (Figura 20 b y c). En estas condiciones fue el único medio en que los parásitos WT se transformaron a tripomastigotes en una mayor proporción (56%) comparado con los otros medios probados anteriormente.



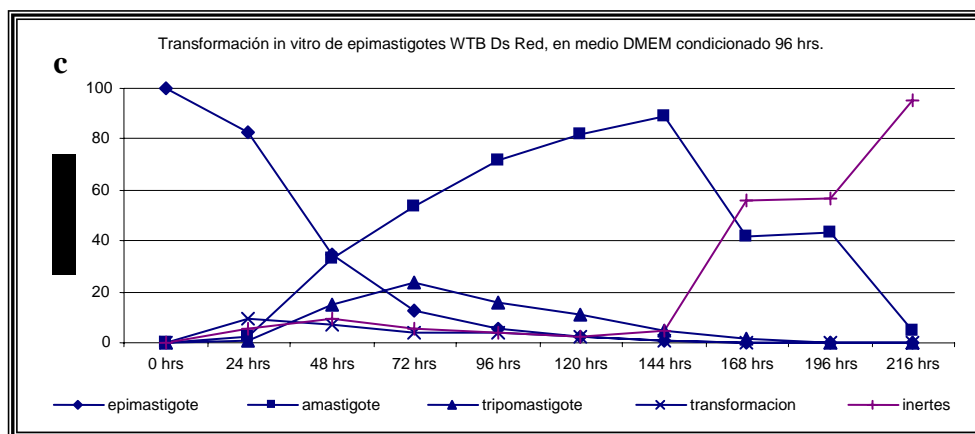


Figura 20. Transformación de epimastigotes WT (a), EGFP (b) y DsRed (c) en medio DMEM condicionado a 96 horas. Los resultados son el promedio de 4 experimentos independientes.

Las infecciones primarias con parásitos EGFP y DsRed dieron como resultado infecciones productivas (Figura 21), mostrando una cinética de infección indistinguible de los parásitos *wild type* (dato no mostrado). Además en estas infecciones se pudo observar que los diferentes estadios de desarrollo del parásito mantuvieron la fluorescencia lo que indica que la expresión de las proteínas EGFP (Figura 22) y DsRed (Figura 23) se mantiene durante la diferenciación del parásito.

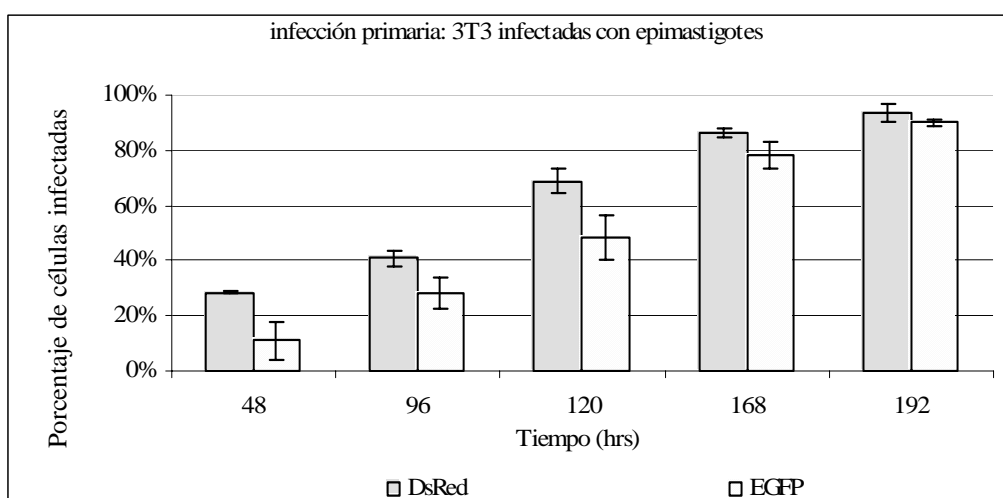


Figura 21. Cinética de infección primaria, fibroblastos 3T3 NIH infectados con epimastigotes EGFP y DsRed. Los resultados son el promedio de 2 experimentos independientes.

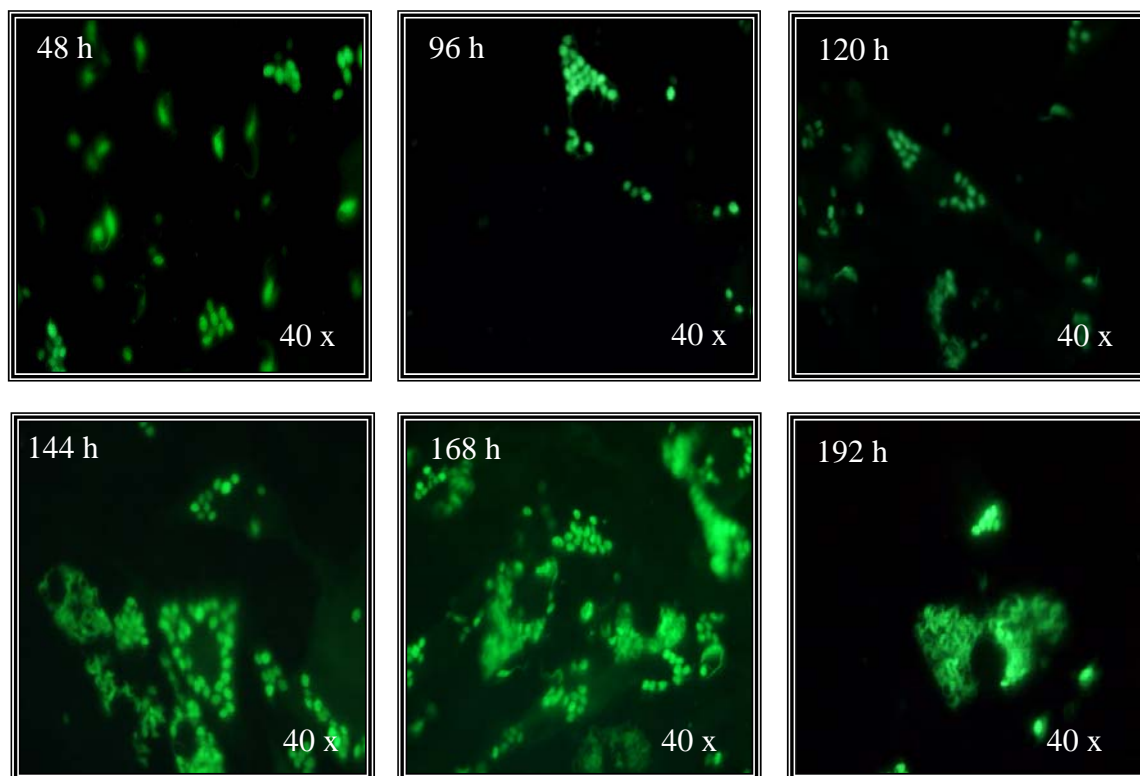


Figura 22. Cinética de infección primaria, fibroblastos 3T3 NIH infectados con epimastigotes expresando la proteína EGFP, monitoreados bajo microscopía de fluorescencia.

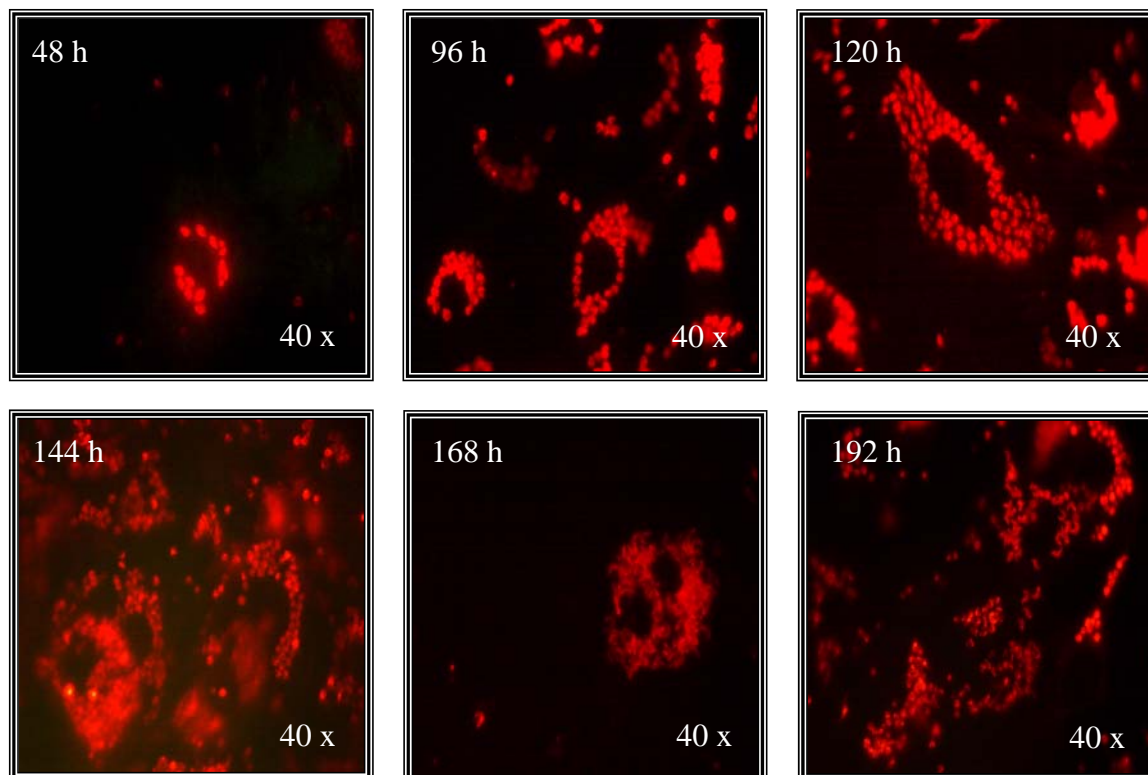
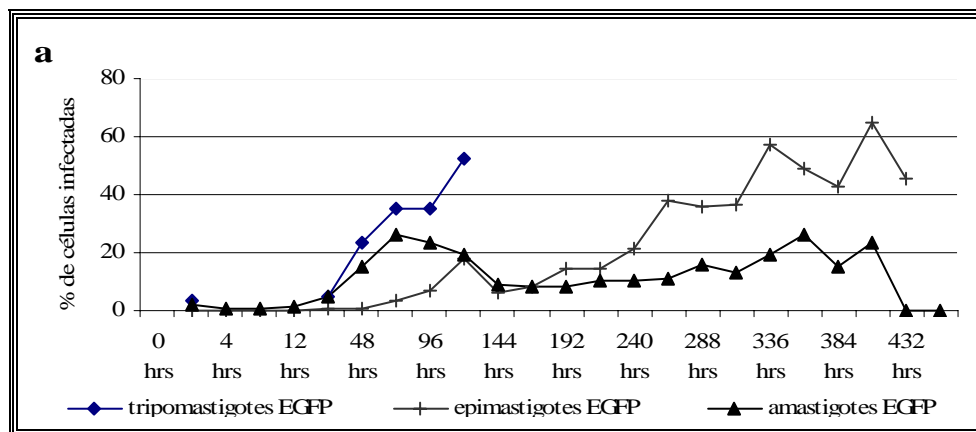


Figura 23. Cinética de infección primaria, fibroblastos 3T3 NIH infectados con epimastigotes expresando la proteína DsRed, monitoreados bajo microscopía de fluorescencia.

Se purificaron tripomastigotes y amastigotes del sobrenadante de células infectadas obteniendo una pureza del 90-95% para cada estadio.

Una vez que se purificaron los diferentes estadios, realizamos infecciones secundarias como se describe en material y métodos. Se contaron el número de células infectadas, número de parásitos intracelulares en división por célula y número de parásitos en el sobrenadante graficando estos valores con respecto al tiempo. El comportamiento de las cinéticas de infección utilizando dos diferentes inóculos (2×10^6 y 1×10^5 parásitos/ml) fueron similares tanto para parásitos EGFP como DsRed (Figura 24 y 25 a y b) obteniéndose como se esperaba, menores niveles de infección con el inóculo bajo (Figura 25 a y b). En estos resultados pudimos apreciar que los tres estadios de desarrollo produjeron infecciones productivas con un comportamiento en las cinéticas de infección similares, solo mostrando diferencias en los tiempos iniciales de la infección (Figura 26 y 27 a, b y c, Figura 34-39). En el caso de tripomastigotes y amastigotes se observaron dentro de la célula huésped a las 2 horas post-infección (Figura 28 y 29 a y b), mientras que los epimastigotes fueron vistos dentro de las primeras 24 horas (Figura 40), aunque esto no siempre se observó por lo que en estos casos las células infectadas fueron consideradas cuando se observaron los epimastigotes transformados a amastigotes entre las 24 a 48 horas después (Figura 28 y 29 a y b). Otra diferencia fue observada en las cinéticas de epimastigotes, en donde el inóculo fue de 2×10^6 parásitos/ml donde pudimos notar mayor número de células infectadas comparado con tripomastigotes o amastigotes (Figura 24 a y b).



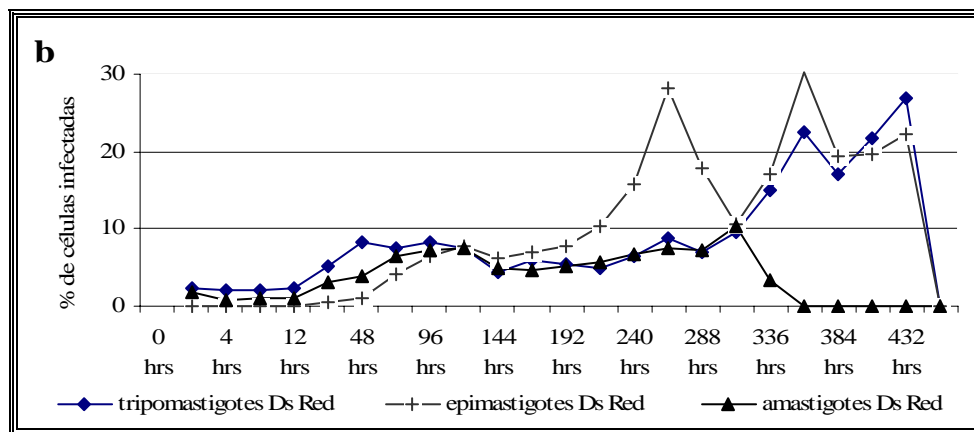


Figura 24. Cinética de infección, fibroblastos 3T3 NIH infectados con 2×10^6 tripomastigotes, amastigotes o epimastigotes EGFP (a) y DsRed (b). Los resultados son el resultado de 3 experimentos independientes.

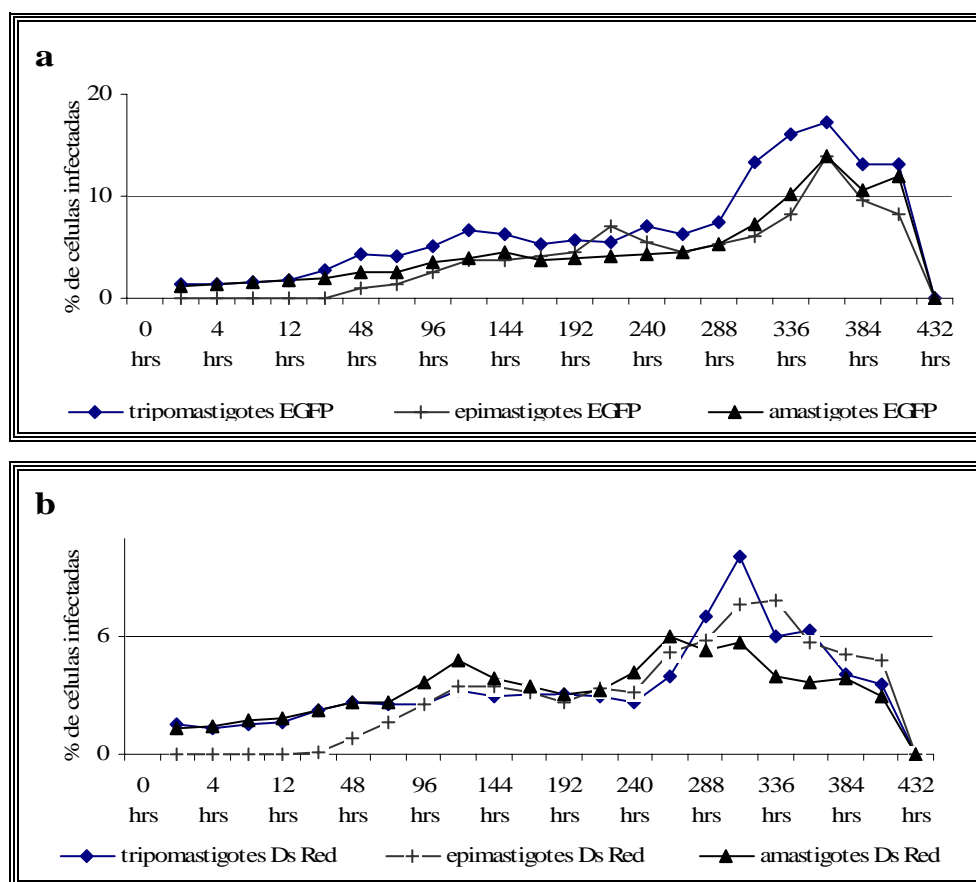


Figura 25. Cinética de infección, fibroblastos 3T3 NIH infectados con 1×10^5 tripomastigotes, amastigotes o epimastigotes EGFP (a) y DsRed (b). Los resultados son el promedio de 9 experimentos independientes.

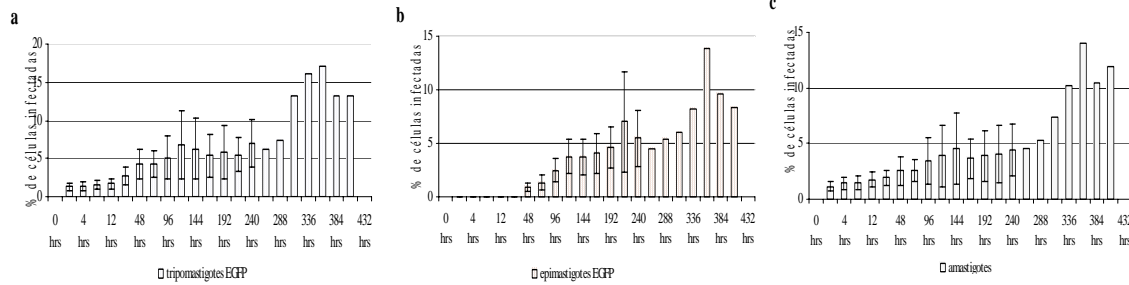


Figura 26. Cinética de infección, fibroblastos 3T3 NIH infectados con 1×10^5 tripomastigotes (a), epimastigotes (b) o amastigotes (c) EGFP. Estos resultados son el promedio de 9 experimentos independientes.

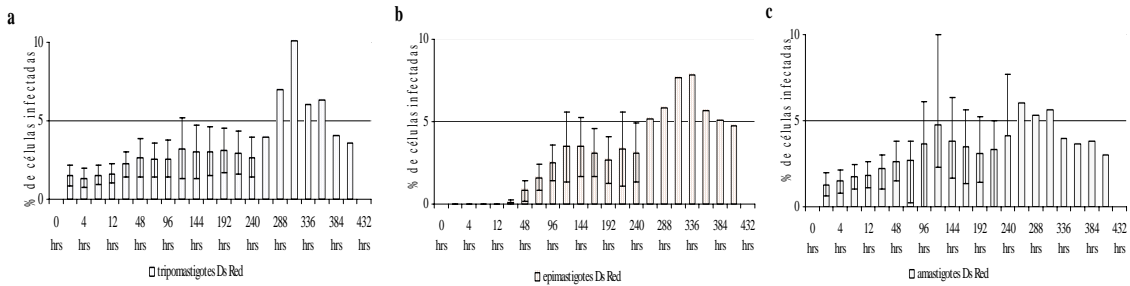


Figura 27. Cinética de infección, fibroblastos 3T3 NIH infectados con 1×10^5 tripomastigotes (a), epimastigotes (b) o amastigotes (c) DsRed. Estos resultados son el promedio de 9 experimentos independientes.

Contrario a lo reportado, en que se ha sugerido que los epimastigotes no infectan fibroblastos (Piras *et al.*, 1982), nuestros resultados mostraron que estos son capaces de invadir (Figura 40 a, b y c), multiplicarse (Figura 35 y 38 a las 48-72 horas) y dar lugar a infecciones productivas (Figura 35 y 38 a las 48-192 horas). Observándose en el interior de la célula entre las 4-8 horas post-infección como epimastigotes (Figura 40 b, PI) y aparentemente transformándose a amastigotes a las 24-48 horas (Figuras 35 y 38). Estos resultados los pudimos observar de igual forma con los dos inóculos utilizados (Figura 28-29 a y b).

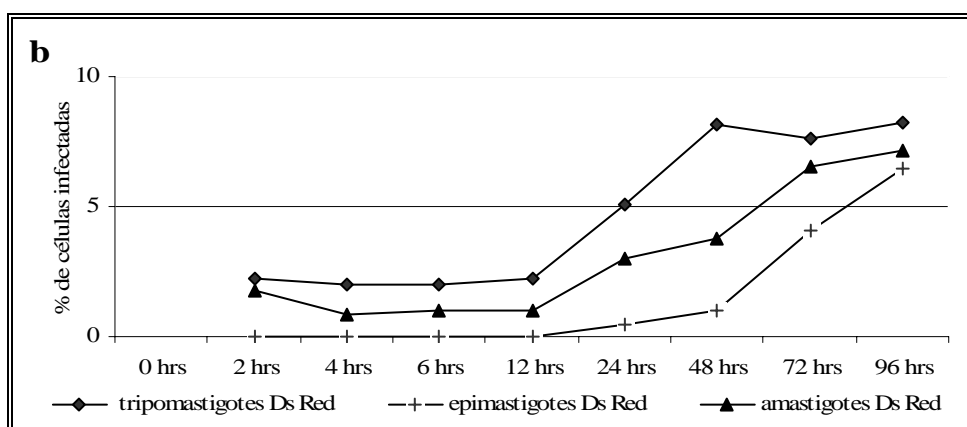
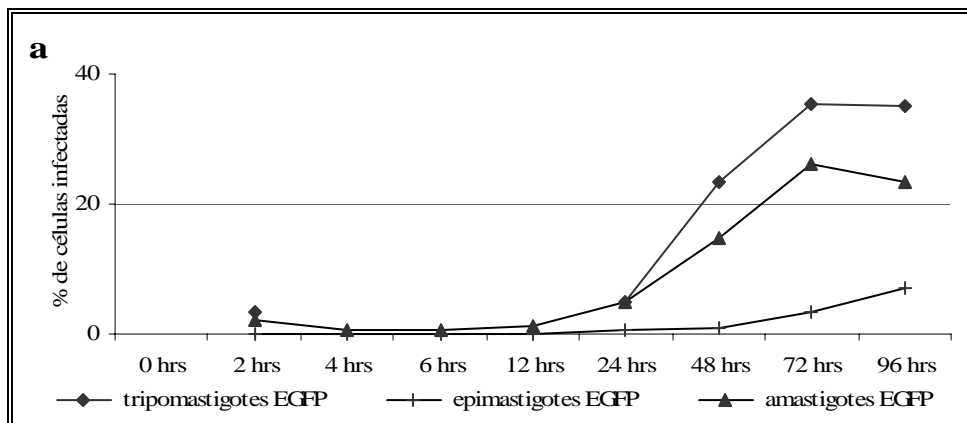
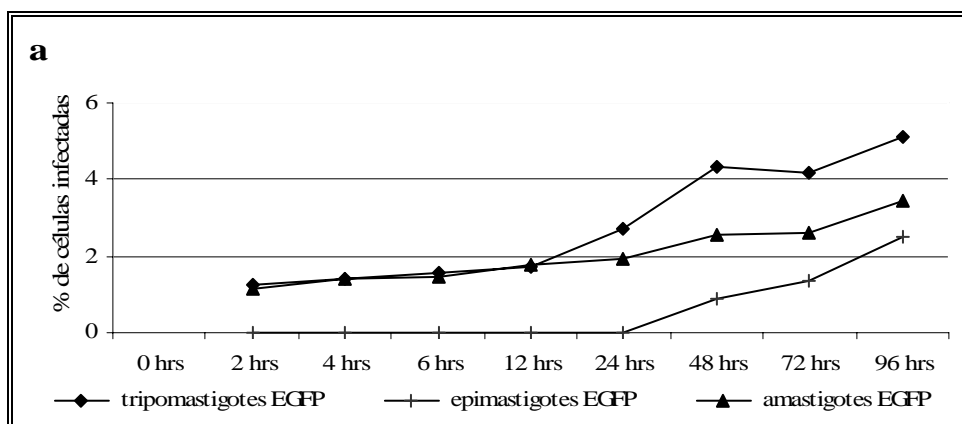


Figura 28. Cinética de infección, fibroblastos 3T3 NIH infectados con 2×10^6 tripomastigotes, amastigotes o epimastigotes EGFP (a) y DsRed (b). Desde las dos primeras horas pudimos observar que tanto tripomastigotes como amastigotes invadieron similar número de células, mientras que los epimastigotes se observaron transformados como amastigotes después de las 24 horas. Estos resultados son el promedio de 3 experimentos independientes.



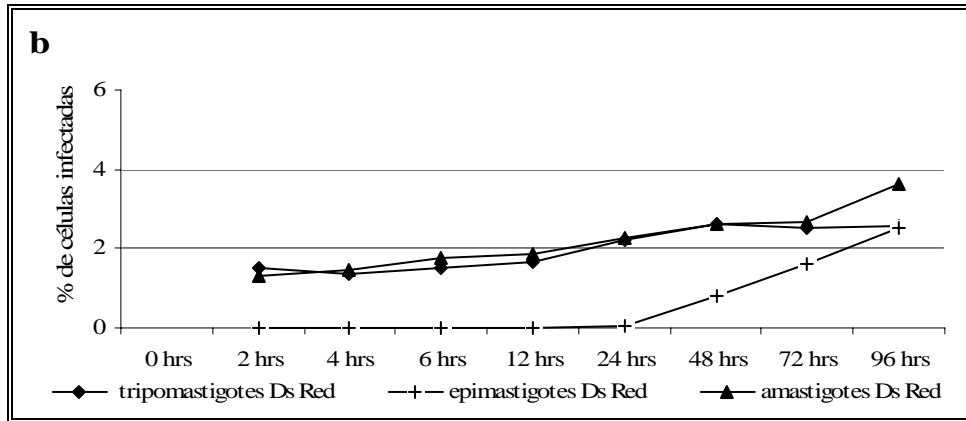
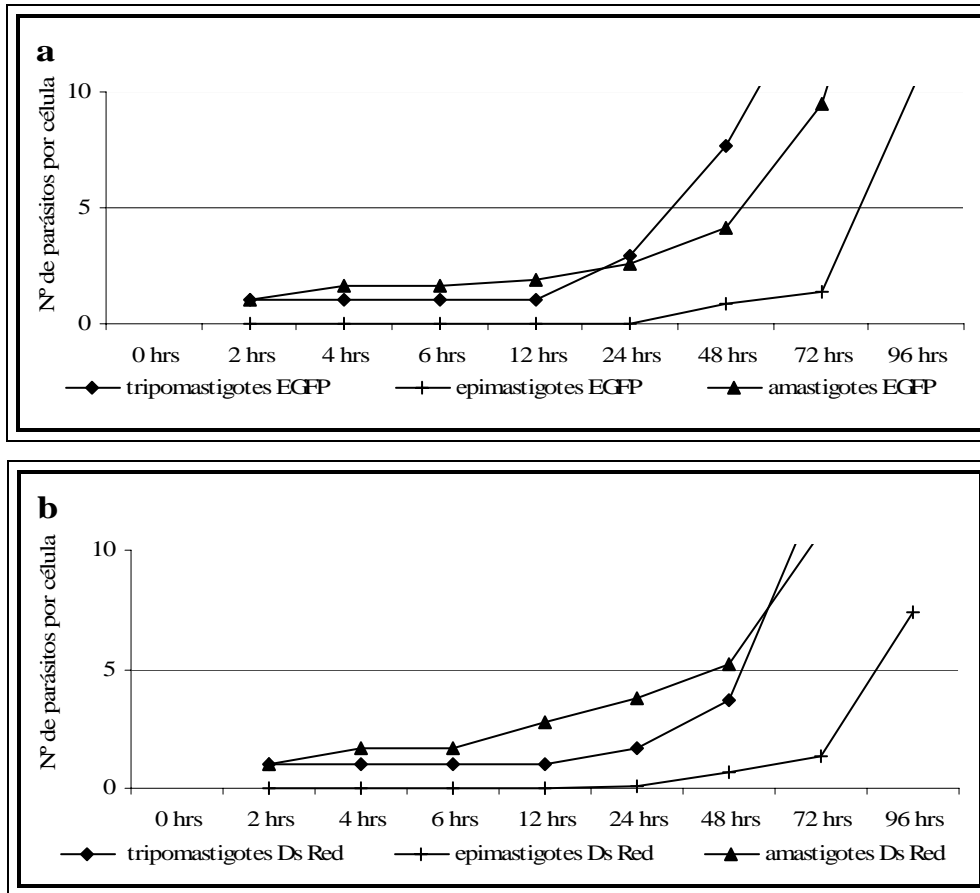
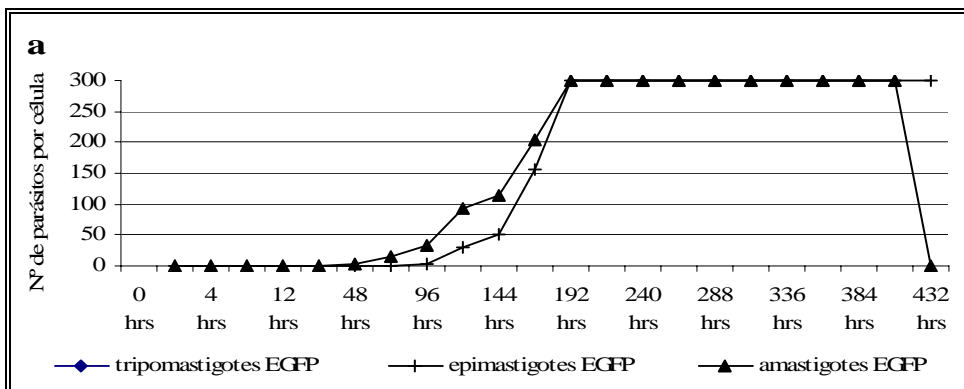


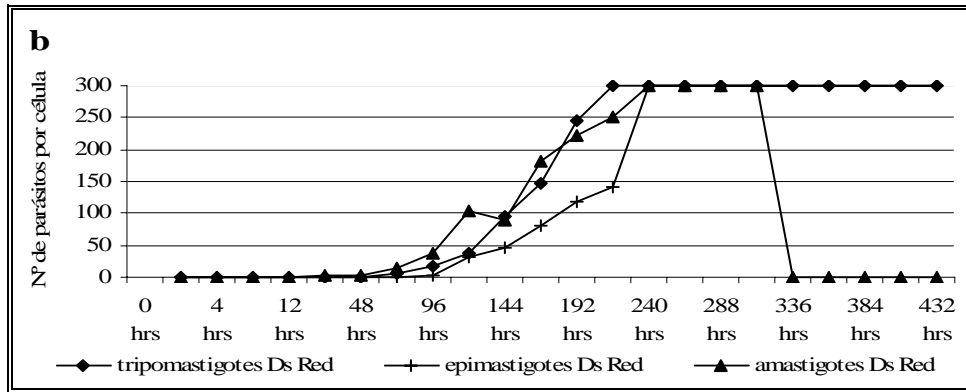
Figura 29. Cinética de infección, fibroblastos 3T3 NIH infectados con 1×10^5 tripomastigotes, amastigotes o epimastigotes EGFP (a) y DsRed (b). Desde las dos primeras horas pudimos observar que tanto tripomastigotes como amastigotes invadieron similar número de células, mientras que los epimastigotes se observaron transformados como amastigotes después de las 24 horas. Los resultados son el promedio de 9 experimentos independientes.

Otra diferencia notable entre las infecciones iniciadas con los diferentes estadios fue cuando observamos la división celular (Figura 30 a y b), en donde los tripomastigotes iniciaron su replicación a las 24 horas, los epimastigotes a las 48-72 horas y los amastigotes a las 4 horas post-infección (Figura 30, 34 y 37 para tripomastigotes, 35 y 38 para epimastigotes y 36 y 39 para amastigotes). Notándose que a los tiempos posteriores durante el progreso de la infección los amastigotes y tripomastigotes presentaron grados de diferenciación similar en el desarrollo de formas intermedias y diferenciación a tripomastigotes (Figuras 34 y 37 a las 96-168 horas en tripomastigotes y Figuras 36 y 39 a las 96-168 horas para amastigotes). Mientras que, los epimastigotes presentaron un retraso en el desarrollo de formas intermedias y diferenciación con respecto a los dos primeros (Figuras 35 y 38 a las 144-192 horas). A pesar de estas diferencias los tres estadios alcanzan niveles altos de infección contándose en algunos casos aproximadamente 300 parásitos por célula (Figura 31-32 a y b). Las observaciones anteriores fueron iguales independientemente del inóculo utilizado (1×10^5 y 2×10^6).

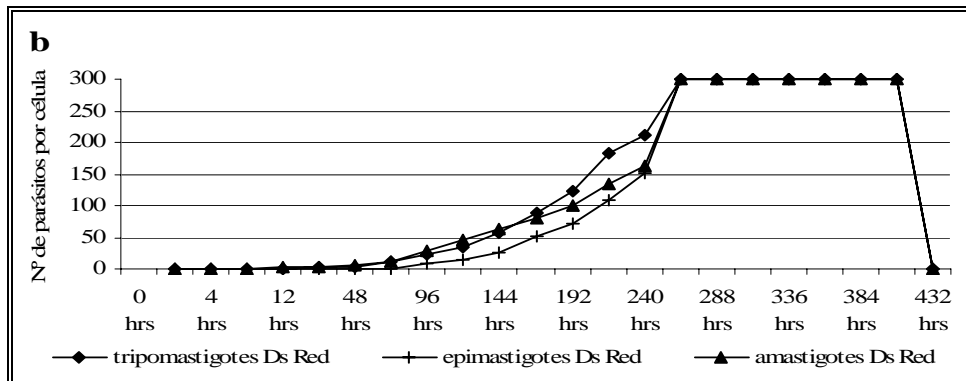
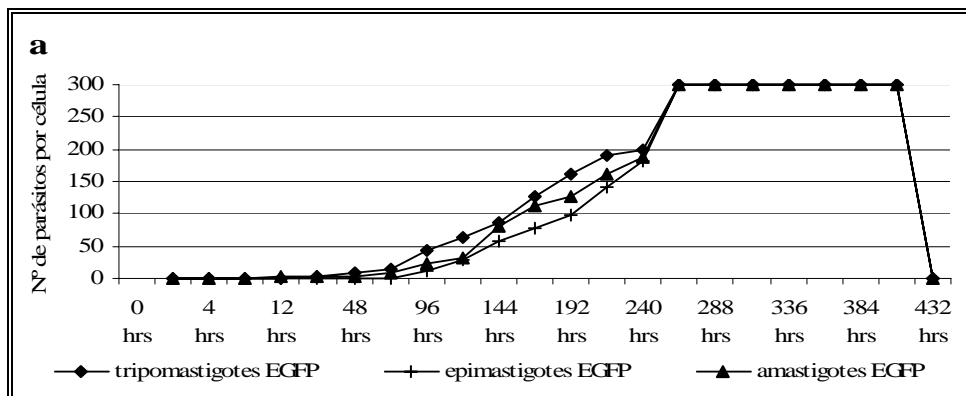


Gráfica 30. Número de parásitos por célula obtenidos a partir de infecciones iniciadas con tripomastigotes, amastigotes o epimastigotes EGFP (a) y DsRed (b). Los resultados son el promedio de 9 experimentos independientes.





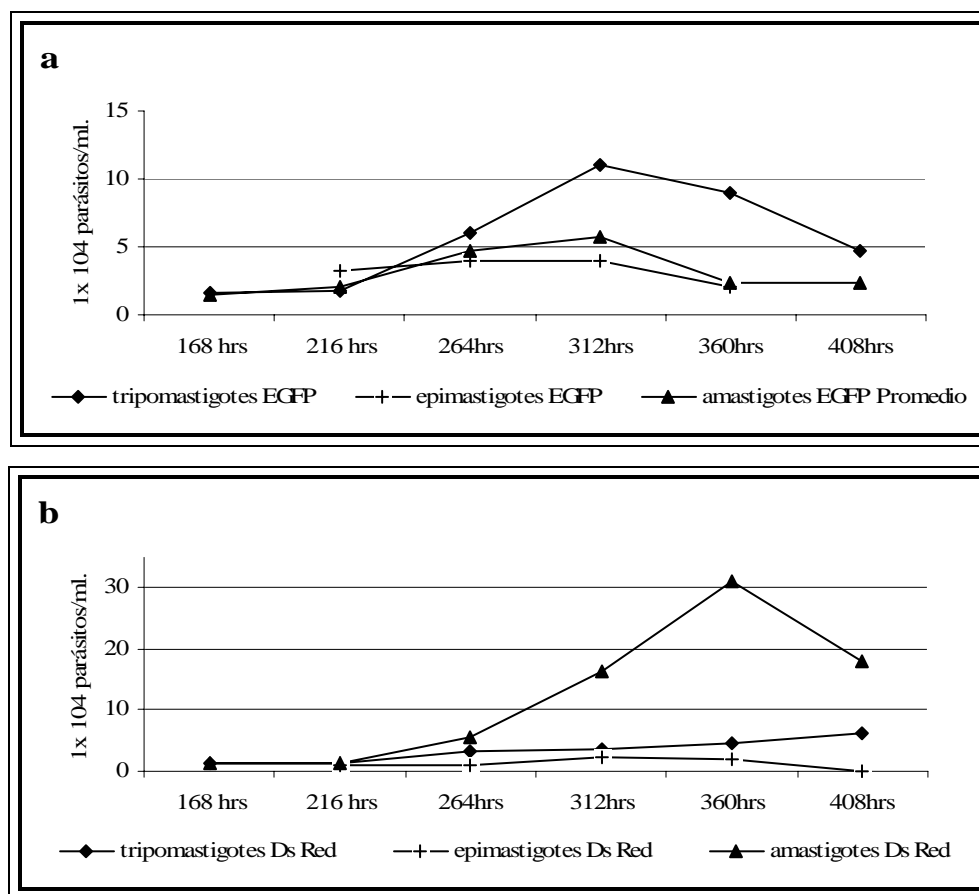
Grafica 31. Número de parásitos por célula obtenidos a partir de infecciones iniciadas con 2×10^6 tripomastigotes, amastigotes o epimastigotes EGFP (a) y DsRed (b). Los resultados son el promedio de 3 experimentos independientes.



Grafica 32. Número de parásitos por célula obtenidos a partir de infecciones iniciadas con 1×10^5 tripomastigotes, amastigotes o epimastigotes EGFP (a) y DsRed (b). Los resultados son el promedio de 9 experimentos independientes.

En todos nuestros experimentos de infección con los diferentes estadios pudimos observar infecciones productivas en las que eventualmente observamos las formas intermedias de amastigotes a tripomastigotes. De igual forma pudimos obtener en todas

nuestras infecciones tripomastigotes intracelulares, los cuales los pudimos observar a partir de las 96 horas y la liberación de estos al exterior se dio a partir de las 168 horas (7 días post-infección) para las infecciones iniciadas con tripomastigotes y amastigotes. Para el caso de epimastigotes, al igual que el tiempo de invasión e inicio de multiplicación intracelular, la diferenciación a tripomastigotes sucedió 48 horas después de las infecciones iniciadas con amastigotes y tripomastigotes (Figura 33 **a** y **b**). También, es interesante resaltar que en este caso los parásitos intracelulares presentaban un grado de diferenciación similar (Figura 35 y 38) contrario a lo observado en las infecciones iniciadas con tripomastigotes y en que un rango grande de diferenciación fue observado (Figura 34, 36, 37 y 39).



Gráfica 33. Número de parásitos liberados al sobrenadante obtenidos a partir de infecciones iniciadas con tripomastigotes, amastigotes o epimastigotes EGFP (a) y DsRed (b). Los resultados son el promedio de 9 experimentos independientes.

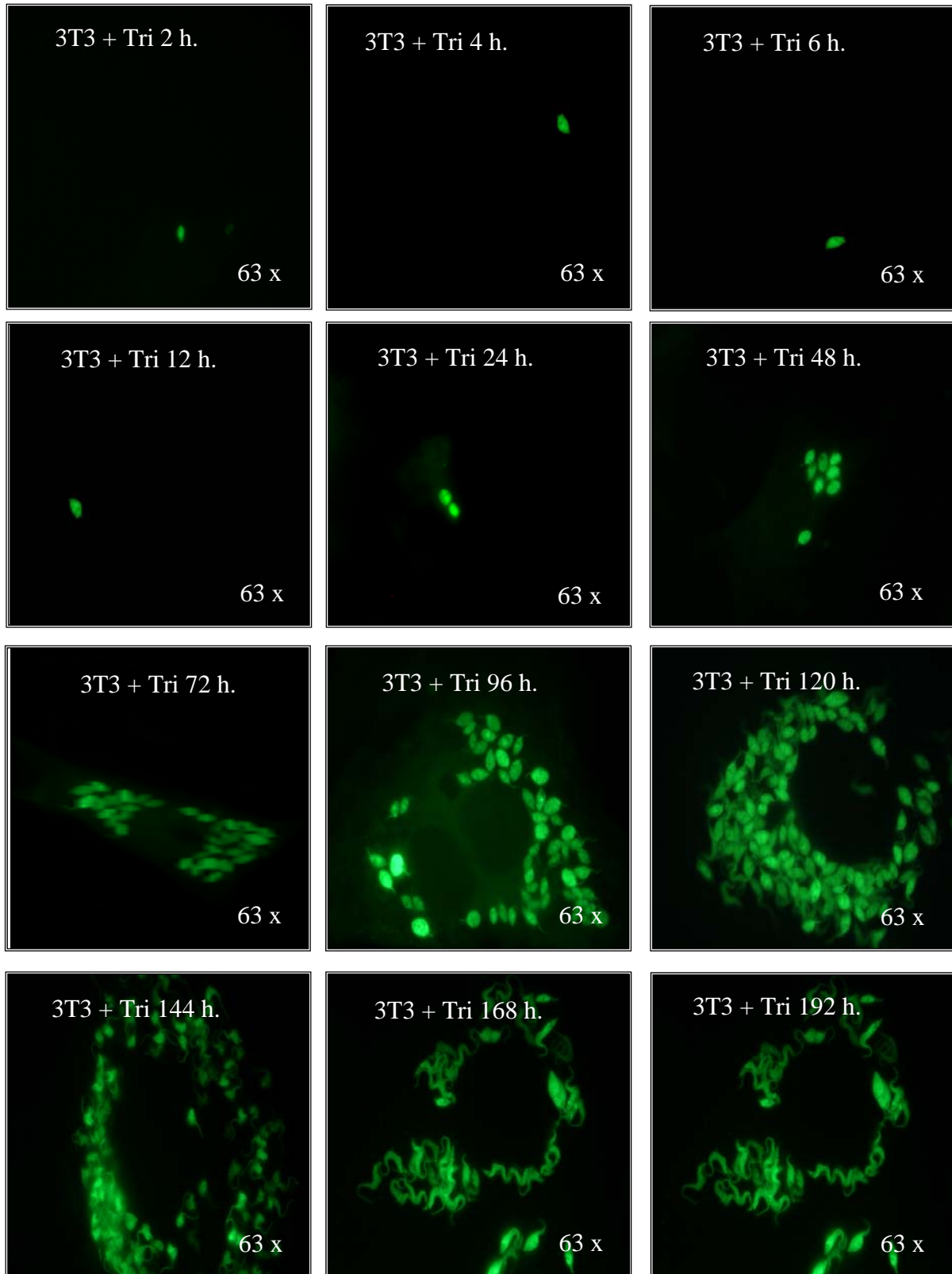


Figura 34. Cinética de infección. Fibroblastos 3T3 NIH infectados con 1×10^5 /ml tripomastigotes expresando la proteína EGFP.

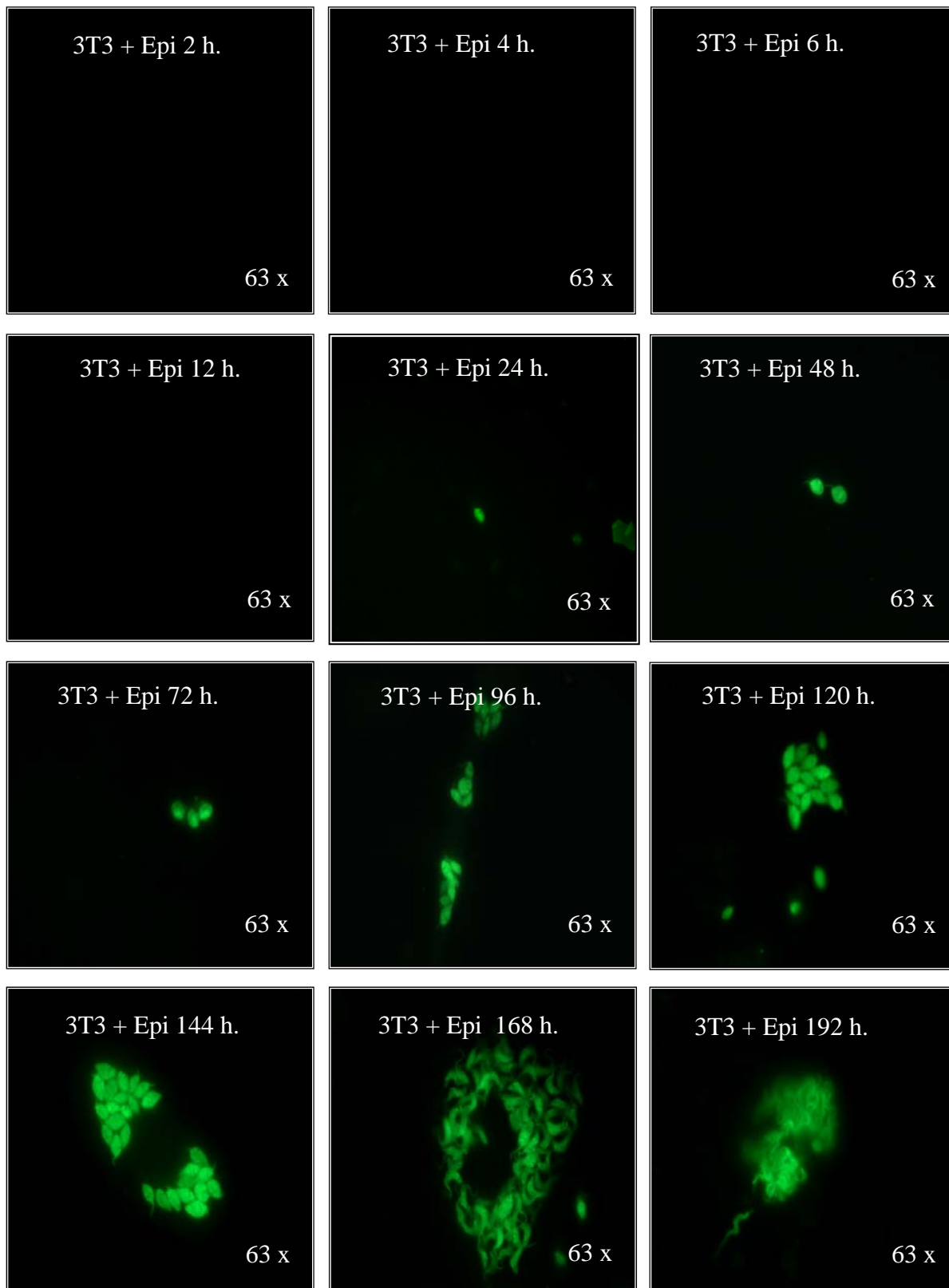


Figura 35. Cinética de infección. Fibroblastos 3T3 NIH infectados con 1×10^5 /ml epimastigotes expresando la proteína EGFP.

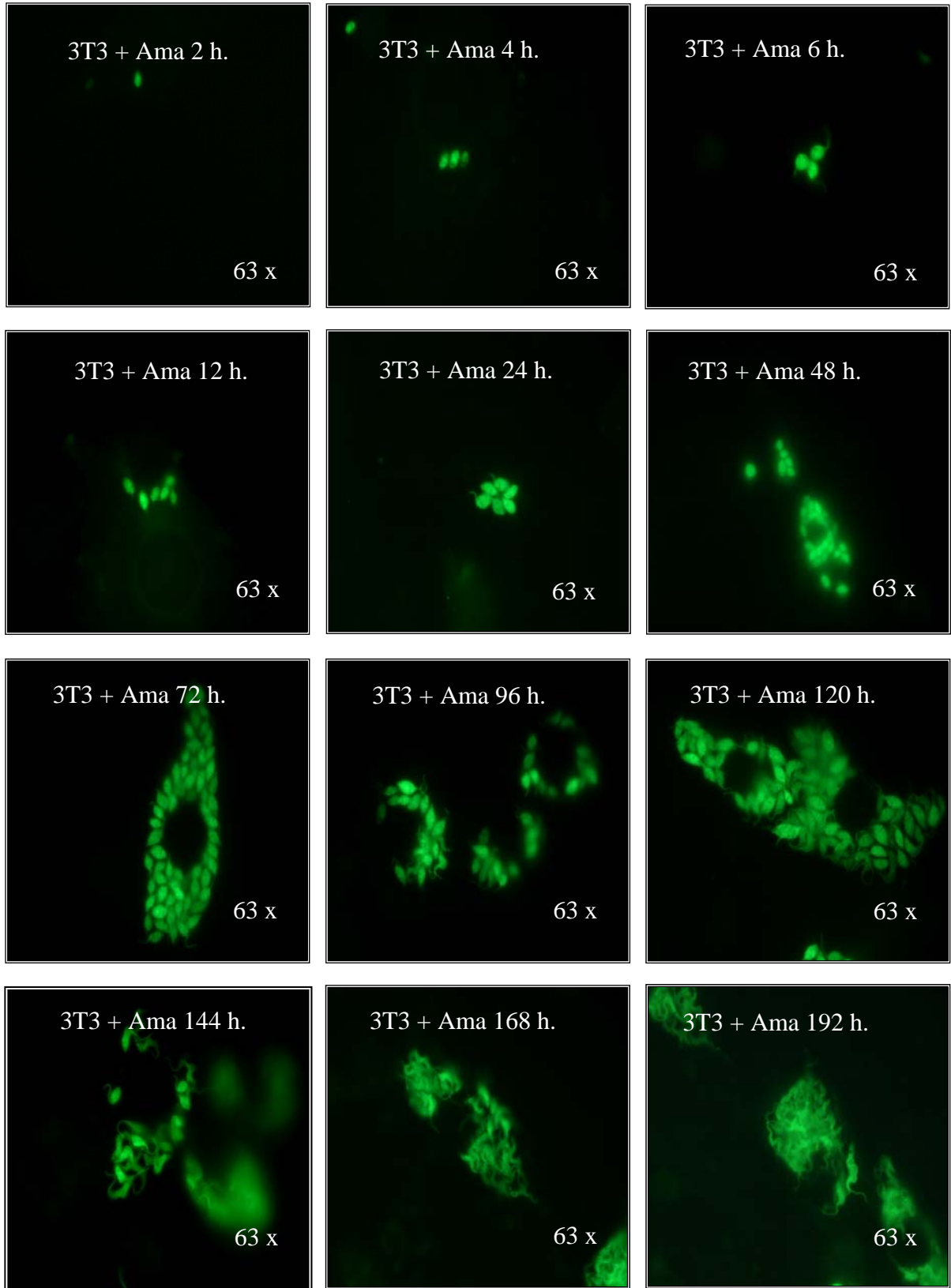


Figura 36. Cinética de infección. Fibroblastos 3T3 NIH infectados con 1×10^5 /ml amastigotes expresando la proteína EGFP.

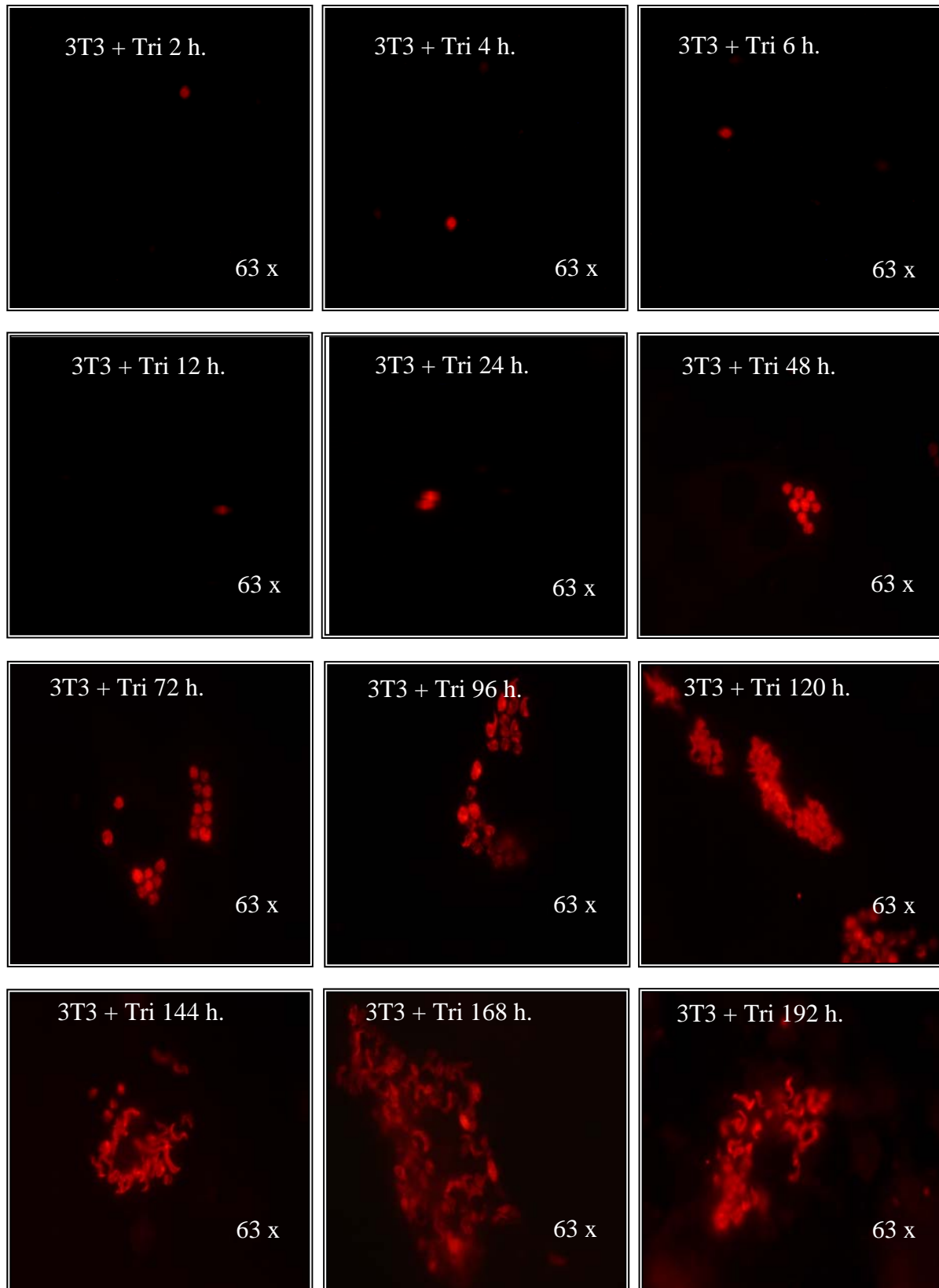


Figura 37. Cinética de infección. Fibroblastos 3T3 NIH infectados con 1×10^5 /ml tripomastigotes expresando la proteína DsRed.

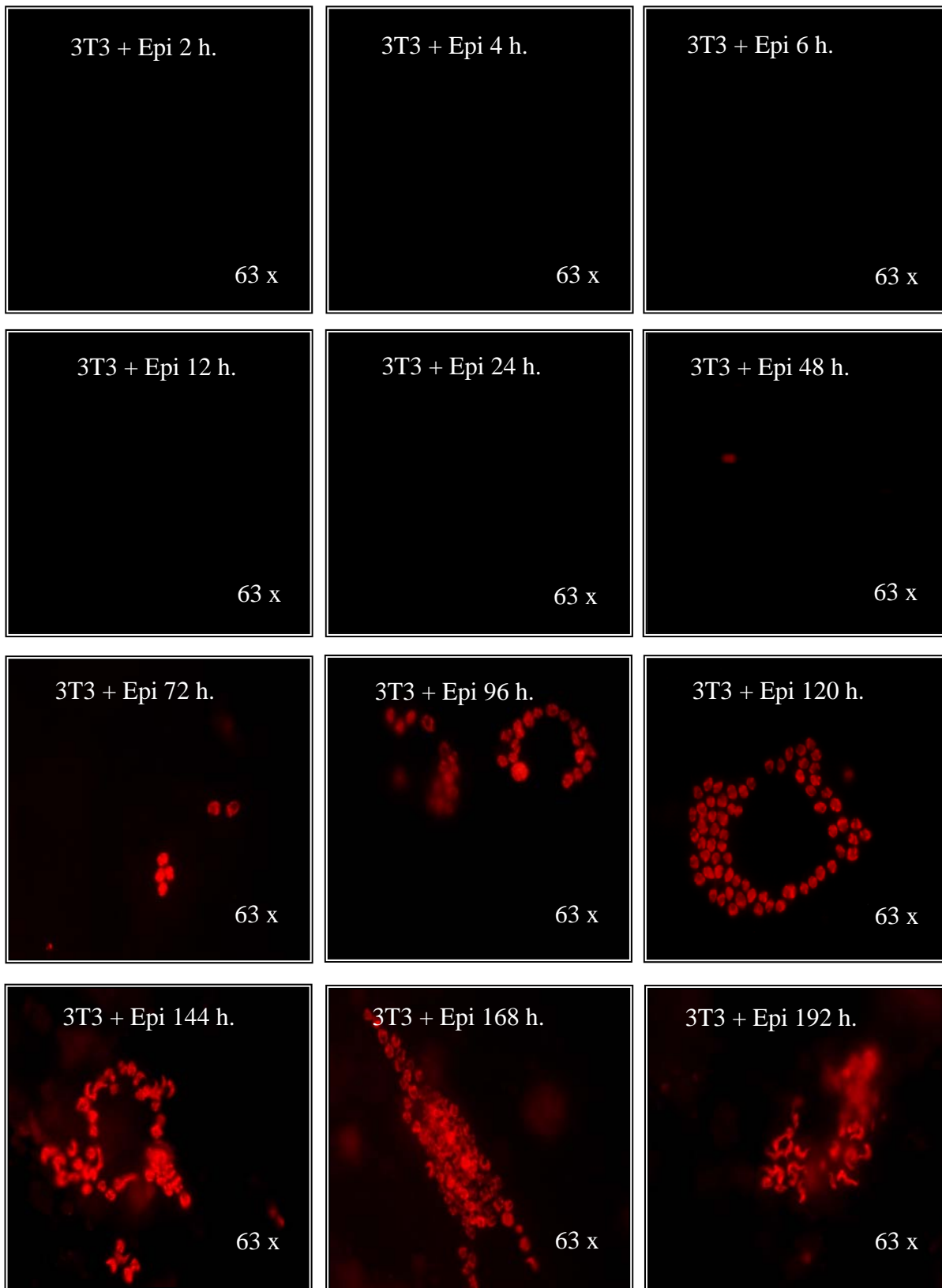


Figura 38. Cinética de infección. Fibroblastos 3T3 NIH infectados con 1×10^5 /ml epimastigotes expresando la proteína DsRed.

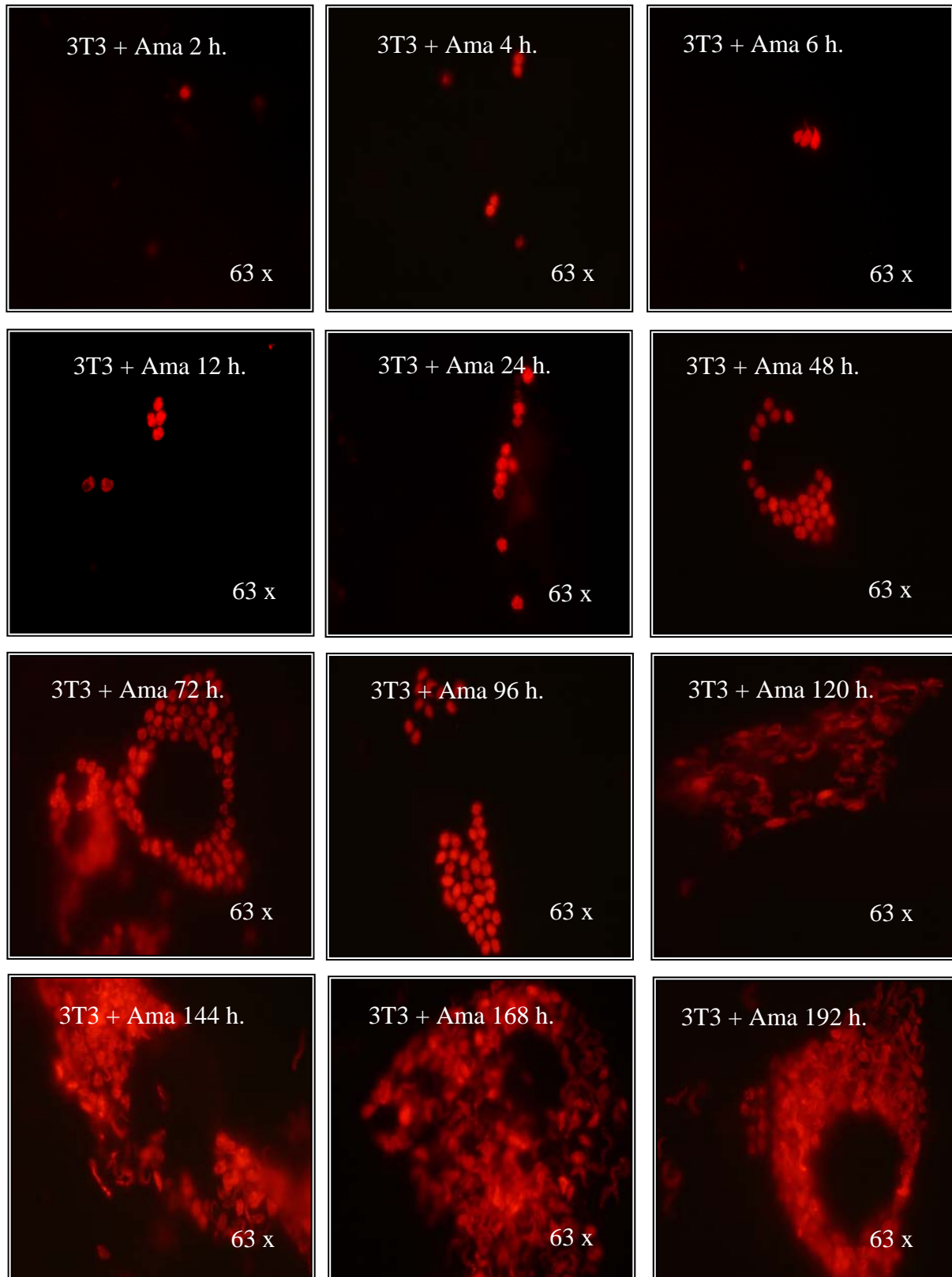


Figura 39. Cinética de infección. Fibroblastos 3T3 NIH infectados con 1×10^5 /ml amastigotes expresando la proteína DsRed.

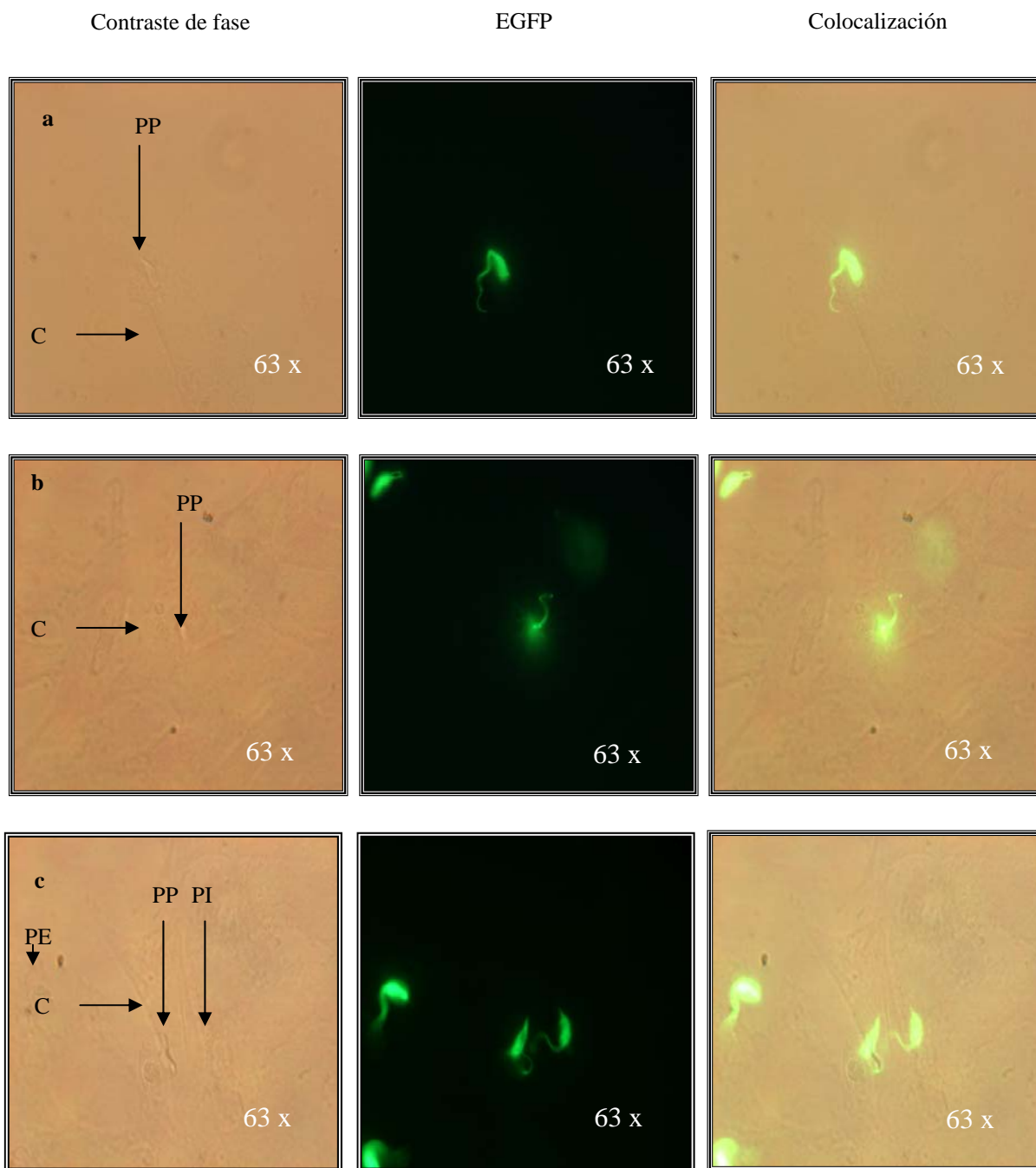


Figura 40. Epimastigotes de *T. cruzi* expresando la proteína EGFP e infectando fibroblastos 3T3 NIH. En **a**, podemos apreciar al parásito (**P**) con la parte anterior de su cuerpo internado en la célula huésped (**C**) 4 horas post-infección, en **b** encontramos el cuerpo del parásito dentro de la célula observando únicamente el flagelo en el exterior y **c** nos muestra un epimastigote en el interior de la célula huésped y otro entrando en ésta a las 8 horas post-infección. Es notoria la diferencia en fluorescencia de los parásitos extracelulares (**PE**) y los intracelulares (**PI**). (**PP**) parásito penetrando a la célula.

6) Discusión

Utilizando la técnica de dilución limitante se pudieron aislar exitosamente distintas clonas de epimastigotes de *T. cruzi* expresando las proteínas EGFP (verde fluorescente) y DsRed (roja fluorescente). Las clonas obtenidas vistas bajo el microscopio de fluorescencia fueron homogéneas en cuanto a la expresión de las proteínas fluorescentes. Las curvas de crecimiento nos mostraron un comportamiento igual al presentado por la cepa *wild type* (WT). También la morfología así como su movimiento no presentaron diferencias con respecto a los parásitos WT. Los resultados anteriores nos indican que la transfección y expresión de las moléculas fluorescentes no tuvieron un efecto deletéreo en los parásitos transfectados. Estos resultados están de acuerdo con lo reportado en la literatura en que se encuentra que la expresión de GFP y DsRed en células eucarióticas no tiene un efecto dañino en la célula transfectadas (Matz *et al.*, 1999).

La exposición de los parásitos transfectados a diferentes pH's permitió confirmar la estabilidad de las proteínas fluorescentes en nuestras condiciones. Durante el proceso de infección *T. cruzi* requiere de su estancia temporal dentro de una vacuola parasitófora con características ácidas, la cual es formada al reclutarse los lisosomas en el sitio de unión del parásito, fusionándose entre ellos y con la membrana plasmática. Esta vacuola transporta al parásito hacia la periferia nuclear de la célula, en donde aproximadamente 2 horas después es liberado en el citoplasma (Rodríguez *et al.*, 1996; Burleigh y Andrews, 1995; Tardieux *et al.*, 1992). Además, se ha observado que la exposición del parásito a pH ácido en el fagosoma es un paso crucial para que se inicie la re-estructuración del tripomastigote que culmina en su diferenciación al estadio replicativo de amastigote (Tomlinson A. *et al.*, 1994; Kanbara *et al.*, 1990). Con estas observaciones y el hecho de que la exposición del parásito a pH ácido esta involucrado en el establecimiento de la infección, fue necesario evaluar la expresión de la proteína verde y roja fluorescente de parásitos transfectados a diferentes pH's. Los resultados obtenidos muestran que la variación del pH no afecto la expresión de ambas proteínas y que estas se mantienen activas al menos dentro de las 3

horas evaluadas. Tiempos posteriores a 3 horas no pudieron ser evaluados ya que la viabilidad de los parásitos decreció progresivamente. Creemos que la presencia de EDTA en el PBS usado en este experimento pudo ser la causa de la muerte de los parásitos. Los resultados fueron similares para ambos tipos de parásitos, mostrando que cerca del 90% se mantuvieron viables dentro de las primeras 24 horas, principalmente a pH's que iban de neutros (7.0) a ácidos (5.0). A pH básico la viabilidad de los parásitos fue decreciendo desde las primeras horas. Nuestros resultados concuerdan con los obtenidos por Tsien *et al.*, en 1998, en donde reportan que los diferentes pH's así como el potencial redox de los diferentes organelos celulares no parecen ser una barrera importante en la expresión de GFP, siendo capaces de expresar y localizar quimeras con GFP en núcleo, mitocondrias, vesículas secretoras, retículo endoplásmico, aparato de Golgi, peroxisomas, vacuolas, fagosomas, citoesqueleto y membrana plasmática permitiendo así realizar experimentos *in vivo*. De igual forma, Geoffrey *et al.*, 2000, señalan que la expresión de la proteína DsRed permanece estable a pH's que van desde 5 a 12.

También fueron evaluados diferentes medios para determinar la eficiencia de transformación *in vitro* de los parásitos WT, EGFP y DsRed. Los resultados fueron comparados con la transformación obtenida en las condiciones control que consistieron en la transformación de los parásitos en infecciones primarias. Los medios utilizados fueron: medio DMEM fresco complementado al 2% SFB y medio DMEM condicionado de 48 horas y 96 horas. En todos los medios probados se observó transformación de epimastigotes a amastigotes extracelulares y tripomastigotes tanto para los parásitos WT como para EGFP y DsRed, siendo en todos los casos mucho mayor la proporción de amastigotes. No sabemos si los epimastigotes se transformaron a amastigotes directamente o si se transformaron primero a tripomastigotes y posteriormente y de manera rápida a amastigotes. Se ha reportado que la incubación de tripomastigotes en medio LIT a un pH neutro durante 24-48 horas da como resultado una transformación del 80% de los parásitos a formas redondeadas parecidas a amastigotes extracelulares (Andrews, *et al.*, 1988). También, se ha reportado que un pH ácido acelera la transformación extracelular de tripomastigotes a un estadio intermedio de forma redonda que finalmente se transforman a amastigotes (Kanbara *et al.*, 1990). Tomlinson, *et al.*, en 1994 observaron que la incubación de tripomastigotes en medio DMEM-BSA a un pH 5.0 a 37°C durante una hora fue

suficiente para observar formas redondas del parásito, mientras que a un pH 7.5 no. De acuerdo a estos antecedentes parece que en diferentes condiciones los tripomastigotes se transforman fácilmente a amastigotes en donde el pH pudiera tener un papel importante pero no esencial. Por otro lado, Pan S. en 1978 sugirió que la transformación es resultado de la acumulación de ácidos orgánicos producidos por los epimastigotes ante un pH ácido el cual induce su diferenciación únicamente a un estadio intermedio. También, en sus experimentos el pH ácido del medio no estimulo la diferenciación de epimastigote a tripomastigote, sugiriendo que la transformación aparentemente esta asociada con la división de epimastigote en medios ácidos. En nuestras condiciones, el medio DMEM fresco tenía un pH de 7.2 mientras que el medio condicionado de 48 y 96 horas tenían un pH de 6.8 y 6 respectivamente por lo que el pH del medio no pareció ser una limitante para la obtención de amastigotes. También, en todos los casos los parásitos EGFP y DsRed se transformaron a amastigotes (80%) de manera aparentemente más eficiente que los parásitos WT (38-60%), sin embargo hasta no analizar diferentes clonas no podemos saber si es resultado de la diferente eficiencia relacionada a las diferentes clonas o a la expresión de las proteínas fluorescentes.

La transformación de los parásitos se pudo observar desde las 24 horas. En la mayoría de los casos los tripomastigotes observados en las primeras horas de incubación decrecieron rápidamente, pero a su vez se incremento la cantidad de amastigotes. Pan en 1978, reportó que los epimastigotes cultivados en medio enriquecido libre de células a 37°C, se transforman a tripomastigotes a las 48 horas y la mayoría de estos son de tipo metacíclicos, posteriormente observo que los tripomastigotes disminuían en número, aumentando el número de amastigotes y promastigotes. Nuestros resultados presentan una tendencia similar en donde en tiempos tempranos es cuando se observan tripomastigotes mientras que a tiempos largos estos disminuyen en número y aumenta el número de amastigotes obteniendo de un 38-60% en parásitos WT y un 80% de éstos en parásitos EGFP y DsRed.

En la literatura se han reportado diferentes medios y condiciones en los que se ha logrado una transformación *in vitro* eficiente. Tomlinson *et al.*, en 1994, indujeron la

transformación de amastigotes a partir de tripomastigotes en medio DMEM-BSA a 37°C. Zaidenberg *et al.*, en el 2000, describieron un protocolo para obtener amastigotes extracelulares a partir de epimastigotes cultivados en medio F69 a 36.5° C, en este protocolo se obtuvo una transformación al estadio de amastigote en los cuales pudieron prolongar los tiempos de cultivo. De igual forma Contreras *et al.*, en el 2002, obtuvieron amastigotes extracelulares mediante la incubación de tripomastigotes en medio MEMTAU a 37°C. Pan S. en 1982, pudo obtener amastigotes extracelulares a partir de epimastigotes utilizando para ello, medios altamente enriquecidos con vitaminas y con un requerimiento de nucleótidos de adenina en alta concentración. Zaidenberg, *et al.*, en 2000 pudieron mantener poblaciones de amastigotes por tiempos indefinidos en medios carentes de los compuestos citados por Pan S. 1982. También, se ha reportado que la presencia de 10% de SFC no permite la transformación del parásito *in vitro* (Tomlinson, *et al.*, 1994), mientras que el estrés fisiológico en el parásito ha resultado en la transformación de epimastigotes a amastigotes en medios complementados con plasma de pollo o vitaminas, nucleótidos y SFB, (Kimura, *et al.*, 1978; Pan S., 1978; Rondinelli, 1988). Estos antecedentes muestran que tanto en medios enriquecidos como no enriquecidos es posible obtener transformación *in vitro* de epimastigotes y tripomastigotes a amastigotes. Nuestros resultados al igual que lo reportado, mostraron que empleando medio fresco con 2% de SFB así como medios condicionados que contienen menos nutrientes que el anterior, en todos los casos pudimos observar transformación de epimastigotes a amastigotes y tripomastigotes.

La diferencia de temperatura entre el huésped insecto-vector y mamífero, induce la diferenciación de promastigote a amastigote en *Leishmania major*, a través de la inducción de las llamadas “proteínas de choque térmico” (Van der Ploeg, *et al.*, en Zaidenberg, *et al.*, 2000), este grupo de proteínas está conservado en *T. cruzi* e inducido por aumento de la temperatura (Carvalho y de Souza en Zaidenber, *et al.*, 2000) y podría ser en parte responsable de la morfogénesis de los epimastigotes observada cuando la temperatura se eleva a 37°C. En este trabajo utilizamos el cambio de temperatura de los epimastigotes de 28° C a 37°C condiciones que junto con los diferentes medios usados posiblemente resultaron en la inducción de la transformación de epimastigotes.

El proceso de infección de tripomastigotes y amastigotes ha sido motivo de estudio durante varios años en los que los modelos descritos hasta la fecha sugieren diversos mecanismos de invasión. Mortara, 1991, utilizando un modelo con células HeLa, demostró que los tripomastigotes y amastigotes interactúan con diferentes estructuras de la célula huésped y sugiere que el proceso de invasión e infección es diferente. Posteriormente el mismo autor (Mortara, *et al.*, 1999) sugiere que el mecanismo de invasión no solamente depende del tipo de la célula huésped, si no también del estadio del parásito, así como de la cepa utilizada. También, Stecconi-Silva, *et al.*, 2003, demostraron que los diferentes estadios de desarrollo del parásito presentan características distintas en el proceso de invasión celular, formación de vacuola parasitófora y su escape de la misma, sugiriendo con estos resultados que presentan diferentes capacidades infectivas.

Para evaluar el mecanismo de infección de los diferentes estadios de desarrollo del parásito realizamos infecciones primarias con parásitos EGFP y DsRed en fibroblastos 3T3 NIH. De estas infecciones se purificaron tripomastigotes y amastigotes EGFP y DsRed de los sobrenadantes. Los epimastigotes se obtuvieron de cultivos en medio LIT. Los diferentes estadios de desarrollo se utilizaron para realizar infecciones secundarias evaluando las cinéticas de infección de acuerdo a lo reportado por nuestro grupo (Manning-Cela, *et al.*, 2002). Los resultados obtenidos nos mostraron que los amastigotes iniciaron su replicación en las primeras 4 horas de haberse internado en la célula huésped mientras que los tripomastigotes y epimastigotes lo hicieron 24 y 48-72 horas después respectivamente. A tiempos posteriores las cinéticas de infección fueron iguales en los tres estadios. En todos los casos se observaron células completamente infectadas y la liberación de parásitos al sobrenadante se dio a las 168 horas para infecciones iniciadas con tripomastigotes y amastigotes y 48 horas después para epimastigotes. Estos resultados sugieren que los tripomastigotes, amastigotes y epimastigotes presentan posibles mecanismos de unión y/o invasión distintos. Estos resultados concuerdan con lo reportado por Ley V., 1988 y 1990, en donde describe que los tripomastigotes una vez que penetran la célula huésped muestran una fase lag de aproximadamente 20 horas para transformarse en amastigotes e iniciar la duplicación de su ADN y su replicación. Este autor sugiere que éste, es un tiempo necesario para la completa transformación a amastigote. En el curso de sus infecciones el mismo

autor pudo observar tripomastigotes en el medio a los 5 días post infección. Este mismo autor describió que los amastigotes se replican rápidamente una vez que han invadido la célula iniciando su síntesis de ADN inmediatamente después de la invasión lo que también concuerda con nuestros resultados.

La capacidad infectiva de tripomastigotes y amastigotes en células fagocíticas y no fagocíticas profesionales ya ha sido reportada (Stteconi-Silva *et al.*, 2003; Mortara *et al.*, 1999; Ley V., 1990, 1988; McCabe *et al.*, 1984); sin embargo, poco se conoce acerca de la infección producida por epimastigotes. Manque *et al.*, 2003, observo que estas formas no son capaces de infectar células HeLa. Carvalho *et al.*, 1999, reportaron que los epimastigotes son fagocitados por macrófagos. También se ha sugerido que los epimastigotes no infectan fibroblastos (Piras *et al.*, 1982). Por otro lado Nogueira N. y Cohn Z., en 1976 sugieren que estas formas pueden entrar a macrófagos pero que aparentemente son destruidos no siendo capaces de establecer una infección. Nuestros resultados indican que los epimastigotes no solo penetran en la célula huésped (Figura 40) si no que también son capaces de dar lugar a infecciones productivas (Figura 35 y 38) mostrando una cinética de invasión aparentemente desfasada con respecto a amastigotes y tripomastigotes. Mientras que los amastigotes y tripomastigotes son vistos dentro de la célula huésped a las 2 horas post-infección, los epimastigotes fueron observados dentro de las primeras 24 horas. También, el tiempo de replicación, diferenciación de estadio y liberación de parásitos al sobrenadante pareciera estar desfasado de 24 a 48 horas después. Estos resultados posiblemente indiquen que los epimastigotes tienen una fase lag antes de poderse diferenciar a amastigotes dentro de la célula huésped e iniciar así su replicación. Hasta el momento no sabemos si se diferencia directamente a amastigote o requiere de transformarse primero a tripomastigote. Tampoco sabemos si entra a través de una vacuola parasitofora con las mismas características que las utilizadas por los otros estadios. Sin duda estudios posteriores serán necesarios para dilucidar esto. La posibilidad de que la infección sea resultado de los epimastigotes que se pudieran haber transformado extracelularmente a tripomastigotes o amastigotes es baja, ya que en nuestro protocolo experimental la interacción de los epimastigotes es únicamente por 2 horas, tiempos en los que sabemos no hay transformación. Ya que existe una clara correlación de la cantidad

inicial de parásitos usados en la infección y los niveles de infección alcanzados parece poco probable que aún cuando algunos de estos epimastigotes pudieran haber quedado unidos a las células hospederas después de los lavados exhaustivos realizados, el número de estos es tan bajo que no justificaría los mismos niveles de infección obtenidos cuando se iniciaron las infecciones con tripomastigotes o amastigotes. Estos resultados están apoyados por otros estudios realizados en nuestro laboratorio en que observamos infecciones en ratones a partir de epimastigotes.

En resumen nuestros resultados sugieren que los tripomastigotes, amastigotes y epimastigotes presentan posibles mecanismos de unión y/o invasión distintos siendo necesarios posteriores estudios para dilucidar estos. El desarrollo de las herramientas moleculares utilizadas en este trabajo sin duda ayudarán para el mejor entendimiento del ciclo de vida y el proceso de infección del parásito brindando información importante no solo para entender mejor la biología de parásito si no también de la patogenia de la enfermedad.

8) Conclusión

1) Se obtuvieron clones de parásitos fluorescentes que muestran niveles de expresión de la proteína EGFP y DsRed constantes.

2) El análisis fenotípico de los parásitos transfectados comparado con la cepa WT indicó que la expresión de las proteínas fluorescentes (EGFP y DsRed) no tiene un efecto deletéreo.

3) La fluorescencia de las proteínas EGFP y DsRed fue estable en un rango de pH de 5 a 10.

4) Utilizando diferentes medios de cultivo se obtuvo una transformación eficiente *in vitro* de epimastigotes a tripomastigotes y amastigotes con los parásitos WT y transfectados (EGFP y DsRed).

5) Los tripomastigotes, amastigotes y epimastigotes dieron lugar a infecciones productivas cuyas cinéticas de infección sugieren posibles mecanismos de unión y/o invasión distintos

9) Referencias

- Allen L.A. and Aderem A. 1996. Molecular definition of distinct cytoskeletal structures involved in complement and receptor mediated phagocytosis in macrophages. *J. Exp. Med.* 184(2): 627-637.
- Allen, L. A., and Aderem, A. 1996. Mechanisms of phagocytosis. *Current Opinion in Immunology*, 8: 36-40.
- Almeida-de-Faria M., Freymüller E., Colli W. and Alves M. J. M. 1999 *Trypanosoma cruzi*: Characterization of an intracellular epimastigote-like form. *Experimental parasitology* 92, 263-274
- Andrews, N. W. 1990. The acid-active hemolysin of *Trypanosoma cruzi*. *Experimental Parasitology*. 71: 241-244.
- Andrews, N. W. 1995. Lysosome recruitment during host cell invasion by *Trypanosoma cruzi*. *Trends Cell Biol.*, 5: 133-137
- Andrews, N. W., Abrams, C. K., Slatin, S. L. and Griffiths, G. 1990. A *T. cruzi*-secreted protein immunologically related to the complement component C9: evidence for membrane pore-forming activity at low pH. *Cell*, 61: 1277-1287.
- Andrews, N.W., Hong, K., Robbins, E.S. and 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., Robbins, E.S., Ley V., Hong, K.S., Nussenzweig V. 1988. Developmentally regulated phospholipase C- mediated release of the major surface glycoprotein of amastigotes of *Trypanosoma cruzi*. *J. Exp. Med.* 167(2): 300-314.
- Araujo-Jorge, T.C. and de Souza W. 1988. Interaction of *Trypanosoma cruzi* with macrophages. Involvement of surface galactose and N-acetyl-D-galactosamine residues in the recognition process. *Acta Trop.*, 41: 17-28
- Araya, J. E., Cano, M. I., Yoshida, N. and Franco da Silveira. J. 1994. Cloning and characterization of a gene for the stage-specific 82 kDa surface antigen of

metacyclic trypomastigotes of *Trypanoma cruzi*. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 65: 161-169

- Bailey, G.B., Leitch, G.J. and Day, D.B. 1985 Chemotaxis by *Entamoeba histolytica*. *J Protozool.*, 32: 341-6.
- Barbosa H. S. and Meirelles M. N. L. (1995) Evidence of participation of cytoskeleton of heart muscle cells during the invasion of *Trypanosoma cruzi*. *Cell Structure and Function* 20: 275-284
- Bard S.G., Zacharias A.D., Tsien Y.R. 2000. Mutagenesis and oligomerization of DsRed, a red fluorescent protein from coral PNAs. *Biochemistry*. Vol. 97, No.22: 11984-11989.
- Barros HC, Verbisck NV, Silva S, Araguth MF, Mortara RA 1997. Distribution of epitopes of *Trypanosoma cruzi* amastigotes during the intracellular life cycle within mammalian cells. *J. Euk. Microbiol.*, 46: 332- 344.
- Brener, Z. 1973. Biology of *Trypanosoma cruzi*. *Ann. Rev. Microbiol.*, 27: 347-383.
- Bruce Alberts, Dennis Bray, Julian Lewis, Martin Raff, Keith Roberts James D. Watson. 1994. *Molecular Biology of the cell*. 3^a ed. Garland Publishing inc. USA.
- Burleigh B. A., and Andrews N. W. (1995) The mechanisms of *Trypanosoma cruzi* invasion of mammalian cells. *Annu. Rev. Microbiol.* 49 : 175-200
- Burleigh, B.A. and Andrews, N.W. 1998. Signaling and host cell invasion by *Trypanosoma cruzi*. *Current Opinion in Microbiology*,. 1: 461-465.
- Burleigh, B.A., Caler, E.V., Webster, P. and Andrews, N.W. 1997. A cytosolic serine endopeptidase from *Trypanosoma cruzi* is required for the generation of Ca²⁺-signaling in mammalian cells. *J. Cell. Biol.*, 136: 609-620.
- Cabello R.C.(1998).*Microbiología y parasitología Humana*. Ed Medica Panamericana. 1^{ra} ed.Buenos Aires Argentina.pp.543-549
- Caler, E. V., Vaena de Avalos, S. Haynes, P. A. Andrews, N. W. and Burleigh, B. A. 1998. Oligopeptidase B-dependent signaling mediates host cell invasion by *Trypanosoma cruzi*. *Embo J.*, 17 :4975-4986.
- Carvalho T. M. U., Ferreira A. G., Coimbra E. S., Rosestolato C. T. F., De Souza W. (1999) Distribution of cytoskeletal structures and organelles of the host cell

-
- during evolution of the intracellular parasitism by *Trypanosoma cruzi*. J. Submicrosc. Cytol. Pathol. 31 (3), 325-333
- Carvalho, T. M.U., De Souza W. And Coimbra E. S. 1999. Internalization of components of the Host Cell Plasma Membrane During Infection by *Trypanosoma cruzi*. Mem. Inst Oswaldo Cruz Vol 94, suppl 1:143-147.
 - Carvalho, T.M.U. and De Souza, W. 1989. Early events related with the behavior of *Trypanosoma cruzi* within an endocytic vacuole in mouse peritoneal macrophage. *Cell Struct. Funct.*, 14: 383-392.
 - Cevallos A.M. y Hernández R. 2002. *Trypanosoma cruzi* y la enfermedad de Chagas (tripanosomiasis americana). Libros Micobios. Departamento de de Biología Molecular, Instituto de Investigaciones Biomédicas UNAM DGSCA. México D.F. Cap 15
 - Cheryl D. y Kuhn R. 1990. Selective Binding of *Trypanosoma cruzi* to host cell membrane polypeptides. *Infection and immunity* 58: 1
 - Chester P., Clifton Rodney J., Wayne E. (1986) parasitología clínica, 2º ed. JGH Editors, México.
 - Contreras V.T., Navarro M.C., De Lima A.L., Arteaga R.G., Duran F., Askue J., Franco Y. 2002. Production of amastigotes from metacyclic trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. Vol. 97(8) 1213.1222.
 - Delgado I. A., Amich S., Prieto S., Salve M.L. (1994). Laboratorio Clínico. Microbiología Mc Graw Hill. Madrid España. pp.487-488
 - Esquerdo Gómez T. (1993) Patología tropical, Masson S. A. , Barcelona, España.
 - Fonseca C. T., Furniel D. J. M., De Souza W., and Ulises de Carvalho T. M. (2002) participation of host cell actin filaments during interaction of Trypomastigote forms of *Trypanosoma cruzi* with host cells. *Cell Structure and Function* 27: 91-98
 - Franco, E. Vazquez-Prado, J. and Meza I. 1997 Fibronectin-derived fragments as inducers of adhesion and chemotaxis of *Entamoeba histolytica* trophozoites. *J Infect Dis.*, 176: 1597-602
 - Frasch, A.C. 2000. Functional diversity in the trans-sialidase and mucin families in *Trypanosoma cruzi*. *Parasitol. Today*, 16: 282-286.

-
- Garcia, E.S. and Azambuja, P. 1991. Development and interactions of *Trypanosoma cruzi* within the insect vector. *Parasitol Today*, 7: 240-244
 - Garrido M. N., Racagni G., Pereira B. M. I., Rodríguez M. A., Luján H. D., Bronia D.H., Machado-Domenech E. E. (2000) Changes in *Trypanosoma cruzi* Phospholipid induced by parasite contact with cell membranes. *Parasitol Res.* 86: 96-100
 - Gottlieb, T.A., Ivanov, I.E., Adesnik, M., Sabatini, D.D. 1993. Actin microfilaments play a critical role in endocytosis at the apical but not the basolateral surface of polarized epithelial cells. *J Cell Biol.*, 120: 695-710.
 - Gruenheid, S. and Finlay, B.B. 2003. Microbial pathogenesis and cytoskeletal function. *Nature*. 17: 775-81.
 - Guzmán-Bracho, C. 2001. Epidemiology of Chagas disease in Mexico: an update *Trends in parasitology*, 17: 372-376
 - Hall, B.F. and Joiner, K.A. 1993. Developmentally-regulated virulence factors of *Trypanosoma cruzi* and their relationship to evasion of host defences. *J. Eukaryot. Microbiol.*, 40: 207-213.
 - Hall, B.F., Webster, P., Ma, A.K., Joiner, K.A. and Andrews, N.W. 1992. Desialylation of lysosomal membrane glycoproteins by *Trypanosoma cruzi*: a role for the surface neuraminidase in facilitating parasite entry into the host cell cytoplasm. *J. Exp. Med.* 176: 313-25.
 - Heyneman D., Goldsmith R. 1995. Parasitología y medicina tropical. Editorial El Manual Moderno. México. 347-359.
 - Hudson L, Snary D, Morgan SJ 1984. *Trypanosoma cruzi*: continuous cultivation with murine cell lines. *Parasitology*, 88: 283-294.
 - Kanbara H., Vemura H., Nakazawa S. y Fukama T. 1990. Effect of low pH on transformation of *Trypanosoma cruzi* trypomastigote to amastigote. *Japanese Journal of parasitology*. 39: 226-228.
 - Kimura E., Ley W.H. y Fernández J.F. 1978. Extracelular in vitro evolution of metacyclic trypomastigotes isolated from *Trypanosoma cruzi* cultures. *Inst. Med. Trop.* 20: 133-138.

-
- Kipnis, T.L., Calich, V.L.G., and Dias da Silva, W. 1979. Active entry of bloodstream forms of *Trypanosoma cruzi* into macrophages. *Parasitology*, 78: 89-98
 - Kolien, A.H. and Schaub, G.A. 2000. The development of *Trypanosoma cruzi* in triatomine. *Parasitol Today*, 16:381-387.
 - Ley, V., Andrews, N.W., Robbins, E.S. and Nussenzweig, V. 1988. Amastigotes of *Trypanosoma cruzi* sustain an infective cycle in mammalian cells. *J Exp Med*, 168: 649- 659.
 - Ley, V., Robbins, E.S., Nussenzweig, V. and Andrews, N.W. 1990. The exit of *Trypanosoma cruzi* from the phagosome is inhibited by raising the pH of acidic compartments. *J. Exp. Med*, 171: 401-413.
 - Lima, M.F., Beltz, L.A. and Kierszenbaum, F. 1988. *Trypanosoma cruzi*: a specific surface marker for the amastigote form. *J. Protozool.*, 35: 108-110.
 - MacCabe R.E., Remington J.S., Araujo F.G. 1984. Mechanisms of invasion and replication of the intracellular stage in *Trypanosoma cruzi*. *Infect and immunity*. nov: 372-376.
 - Málaga, S. and Yoshida, N. 2001. Targeted reduction in expression of *Trypanosoma cruzi* surface glycoprotein gp90 increases parasite infectivity. *Infect. Immun.*, 69: 353-359.
 - Manning-Cela R.G.,Gonzalez A.y Swindle J. 2002. Alternative splicing of *LYTI* transcripts in *Trypanosoma cruzi*. *Infect. Immun.*, 70: 4726-4728.
 - Manning-Cela, R.G., Cortés, A., González-Rey, E., Van, V.W.C., Swindle, J. and González, A. 2001. The *LYTI* gene product is required for efficient infection by *Trypanosoma cruzi*. *Infect. Immun.*, 69:3916-3923.
 - Manque P.M. Neira J. Atayde V.A., Cordero E., Ferreira A.T., Franco de Silveira J., Ramírez M., Yoshida N. 2003. Cell Adhesión and Ca²⁺ Signaling Activity in Stably Transfected *Trypanosoma cruzi* Epimastigotes Expressin the Metacyclic Stage Specific Surface Molecule Gp82. *Infection and Immunity*. Vol. 7, No.3: 1561-1565.
 - Martínez P.S.A., Gutierrez M.E. 1985. Introducción a la parasitología. 1ª. Ed. México, Editorial Trillas.

-
- Matz VM., Fradkov F.A., Labas A.Y., Savitsky P.A., Zaraisky G.A., Markelov L.M. and Lukyanov A.S. , 1999. Fluorescent proteins from nonbioluminescent Anthozoa species. *Nature Biotechnology*. Vol. 17 october.
 - Meirelles, M.N.L., Chiari, E. and De Souza, W. 1982. Interaction of bloodstream, tissue culture-derived trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi* with macrophages. *Acta Trop.*, 39: 195-203.
 - Miles M. A., Feliciangeli M. D., Rojas de Arias A., 2003. American trypanosomiasis (Chagas disease) and the role of molecular epidemiology in guiding control strategies. *Bio –Chemistry journal.*, 326: 1444-448
 - Morel, C. M., 1999. Chagas disease, from discovery to control and beyond: History, Myths and Lessons to take home, *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 94, Suppl. 1: 3-16.
 - Mortara R. A., Procopio D. O., Barros. H. C. Verbisck N. V., Andreoli W. K., Silva R. BS., Silva S. (1999) Features of cell invasion by different infective forms of *Trypanosoma cruzi*. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. Vol 94, Suppl. 1 : 135-137.
 - Mortara, R.A. 1991. *Trypanosoma cruzi*: amastigotes and trypomastigotes interact with different structures on the surface of HeLa cells. *Exp. Parasitol.*, 73: 1-14.
 - Nogueira N. and Cohn, Z. 1976. *Trypanosoma cruzi*: Mechanism of entry and intracellular fate in mammalian cells. *J. Exp. Med.*, 143: 1402-1420.
 - Nogueira N. Y Rodriguez C.C.N., Warren S.K. and Mahmoud A.F.A. 1984. *Tropical and Geographical Medicine*, McGrawHill, USA. 1175pp.
 - Ojeda-Luna M.C., Murguia-Martinez P. 1998. Chagas disease or American trypanosomiasis. *Gac. Med. Mex.* 134(6): 757-759.
 - Pan, A.A., and McMahan-Pratt, D. 1989. Amastigote and epimastigote stage-specific components of *Trypanosoma cruzi* characterized by using monoclonal antibodies. *J. Immunol.*, 143: 1001-1008.
 - Pan, S.C. 1978. *Trypanosoma cruzi* intracellular stages grown in a cell free medium at 37° C. *Experimental Parasitology* 115: 215-224.
 - Pan, S.C. 1982. Establishment of clones of *Trypanosoma cruzi* and their characterization *in vivo* and *in vitro*. *Bull. WHO* 60: 101-107.
 - Pan, S.C.-T. 1978. *Trypanosoma cruzi*: In vitro interactions between cultured amastigotes and human skin- muscle cells. *Exp. Parasitol.*, 45: 274-286.

-
- Piras M.M., Piras E., Henriquez A., Negri S. 1982. Changes in morphology and infectivity of cell culture derived trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi*. *Molecular and Biochemical*. 6:67-81.
 - Pollard J. W. and Walker John M. 1990. Animal Cell Culture. Methods in Molecular Biology. Vol 5. Ed. Humana Press. USA. 713pp.
 - Procópio, D.O, Silva, S., Cunningham, C.C. and Mortara, R.A. 1998. *Trypanosoma cruzi*: Effect of protein kinase inhibitors and cytoskeletal protein organization and expression on host cell invasion by amastigotes and metacyclic trypomastigotes. *Exp. Parasitology*, 90: 1-13.
 - Procopio, D.O. and Mortara, R.A. 1994. The mechanisms used by two developmental forms of *Trypanosoma cruzi* to invade mammalian cells are different and may be dependent on host cells. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 89: 61
 - Rodríguez A., Martínez I., Chung A., Berlot C. H., and Andrews N. W. (1999) cAMP regulates Ca⁺² dependent exocytosis of lysosomes and lysosome-mediated cell invasion by Trypanosomes. *The Journal of Biological Chemistry*. 274 (24) : 16754-16759
 - Rodríguez A., Rioult G. M., Ora A., and Andrews N. W. (1995) A trypanosome-soluble factor induces IP₃ formation intracellular Ca⁺² mobilization and microfilament rearrangement in host cells. *The Journal of Cell Biology* 129 (5) : 1263-1273
 - Rodriguez, A., Samoff, E., Rioult, M. G., Chung, A. and Andrews, N. W. 1996. Host cell invasion by trypanosomes requires lysosomes and microtubule/kinesin-mediated transport. *J. Cell Biol.*, 134:349-362.
 - Rondinell E. 1994. Conservation of heat shock proteins in *Trypanosoma cruzi*. *Parasitology*. 10: 172-176.
 - Rosestolato, C. T. F., Furniel D. J. da M., De Souza, W. and Carvalho, T. M. U. 2002. Participation of Host Cell Actin Filaments during Interaction of Trypomastigote Forms of *Trypanosoma cruzi* with Host Cells. *Cell Structure and Function*, 27: 91-98
 - Ruiz, R. C., Favoreto, S., Dorta, M. L., Oshiro, M. E. M., Ferreira, A. T., Manque, P. M. and Yoshida, N. 1998. Infectivity of *Trypanoma cruzi* strains is associated

with differential expression of surface glycoproteins with differential Ca^{2+} signaling activity. *Biochem. J.*, 330: 505-511.

- Sanches H.B.E. 1996. Uso de ELISA, Western blot y hemocultivo para el estudio de la enfermedad de Chagas en el estado de Morelos. Tesis para obtener el título de Químico Biólogo, Escuela de Ciencias Químicas, Universidad Autónoma Benito Juárez de Oaxaca.
- Scharfstein, J., Schmitz, V., Morandi, V., Capella, M.M., Lima, A.P., Morrot, A., Juliano, and L., Muller-Esterl, W. 2000. Host cell invasion by *Trypanosoma cruzi* is potentiated by activation of bradykinin B(2) receptors. *J. Exp. Med.*, 92:1289-1300
- Schenkman, S. and Mortara, R.A. 1992. HeLa cells extend and internalize pseudopodia during active invasion by *Trypanosoma cruzi*. *J. Cell Sci.*, 101: 895-905.
- Schenkman, S., Andrews, N. W., Nussenzweig, V. and Robbins, E. S. 1988. *Trypanosoma cruzi* invade a mammalian epithelial cell in a polarized manner. *Cell*, 55: 157-165
- Schenkman, S., Robins, E.S. and Nussenzweig, V. 1991. Attachment of *Trypanosoma cruzi* to mammalian cells requires parasite energy, and invasion can be independent of target cell cytoskeleton. *Infect. Immun.*, 59: 645-654.
- Soler, A.P., Gilliard, G., Xiong, Y., Knudsen, K.A., Martin, J.L., De Suarez, C.B., Mota Gamboa, J.D., Mosca, W. and Zoppi, L.B. 2001. Overexpression of neural cell adhesion molecule in Chagas' myocarditis. *Hum Pathol.*, 32: 149-55.
- Stecconi-Silva R.B., Andreoli W.K., Mortara R.A. 2003. Parameters affecting cellular invasion and escape from the parasitophorous vacuole by different infective forms of *Trypanosoma cruzi*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. Vol. 98(2):953-958.
- Swanson, J. A. and Baer, S.C. 1995. Phagocytosis by zippers and triggers. *Trends in Cell Biology*, 5: 89-93.
- Tardieux I., Webster P., Ravesloot J., Boron W., Lunn J. A., Heuser J. E., Andrews N. W. (1992) Lysosome recruitment and fusion are early events required for trypanosoma invasion of mammalian cells. *Cell* Vol 71, 1117-1130
- Tardieux, I., Nathanson, P. and Andrews, N.W. 1994. Role in host cell invasion of *Trypanosoma cruzi*-induced cytosolic-free calcium transients. *J. Exp. Med.*, 179: 1017-1022.

-
- Tardieux, I., Webster, P., Ravestloot, J., Boron, W., Lunn, J. A., Heuser, J. E. and Andrews, N. W. 1992. Lysosome recruitment and fusion are early events required for trypanosome invasion of mammalian cells. *Cell*, 71: 1117-1130
 - Tay Azala J. (1994), microbiología y patología medica, 2° ed. Editores Méndez, México
 - Todaro, G.J., and H. Green, 1963, Quantitative studies of the growth of mouse embryo cells in culture and their development into established lines. *J. Cell. Biol.*, 17:229.
 - Tomlinson S.F., Vandekerckhoue, Frevert V. Y Nussenzweig V. 1995. The induction of *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes to amastigote transformation by low pH. *Parasitology*. 110: 547-554.
 - Tsien Roger Y. 1998. The Green Fluorescent Protein. *Annual Review Biochemical*. 67: 509-544.
 - Tyler K. M. And Engman D. M. (2000) Flagellar elongation induced by glucose limitation is preadaptative for *Trypanosoma cruzi* differentiation. *Cell Motility and the Cytoskeleton* 46: 269-278
 - Tyler K. M. and Engman D. M. (2001) the life cycle of *Trypanosoma cruzi* revisited. *International Journal for Parasitology* 31: 472-481
 - Umezawa, E.S., Milder, R.V. and Abrahamsohn, I.A. 1985. *Trypanosoma cruzi* amastigotes: development in vitro and infectivity in vivo of the forms isolated from spleen and liver. *Acta Tropica (Basel)* 42: 25-32.
 - Velasco, O. 1991. La enfermedad de Chagas. Publicación técnica del INDRE, Secretaria de Salud. México D.F. 8:56.
 - Villalta, F. and Kierszenbaum, F. 1982. Growth of isolated amastigotes of *Trypanosoma cruzi* in cell-free medium. *J. Protozool.*, 29: 570-576
 - Villalta, F. and Kierszenbaum, F. 1984. Role of inflammatory cells in Chagas' disease. II. Interactions of mouse macrophages and human monocytes with intracellular forms of *Trypanosoma cruzi*: Uptake and mechanism of destruction. *J. Immunology.*, 133: 3338-3343.

- Wendel, Z. S. Rassi. Brener, M.E. Camargo, A.1992, Chagas Disease American Trypanosomiasis: its impact on transfusion and clinical medicine. Edt. ISBT BRAZIL, SAO PAULO, BRAZIL.
- WHO 1996. World Health Organization. Chagas' Disease.
- Yang, F., Moss, L. G., Phillips, G. N. Jr. 1996. Molecular Structure of Green Fluorescent Protein. *Nature Biotechnology*. 14, 1246-1251.
- Zaidenberg A., Tournier H.A., Schinella G.R., Buschiazzi H.O. 2000. *Trypanosoma cruzi*: obtención de amastigotes extracelulares y estudio de su crecimiento en diferentes condiciones de cultivo. *Revista latinoamericana de Microbiología* 42: 21-26.
- Zeledon, R. 1997. Infection of the insect host by *Trypanosoma cruzi*. In "Atlas of Chaga's Disease Vectors in the Americas. Editora Fiocruz. 1: 271-287.
- Zenian, A. and Kierszenbaum, F. 1983. *Trypanosoma cruzi*: differences in cell surface interaction of circulating (trypomastigote) and culture (epimastigote) forms with macrophages. *J. Parasitol.*, 69: 660-665.