

ESTUDIO Y CARACTERIZACION DE  
PROTEINAS DE Trypanosoma cruzi  
SUSCEPTIBLES DE PRODUCIR  
CAMBIOS EN SU CELULA  
HOSPEDADORA

MARIA DE LAS NIEVES RODRIGUEZ CABEZAS.

Granada, Febrero de 1991.



ACTA DE GRADO DE DOCTOR

DOCTORANDO D. M<sup>a</sup> NIEVES RODRIGUEZ CABEZAS  
 LICENCIADO EN FARMACIA por la Universidad de GRANADA  
 PROGRAMA DE DOCTORADO FUNDAMENTOS Y TECNICAS EN PARASITOLOGIA EXPERIMENTAL  
 DEPARTAMENTO RESPONSABLE PAR. SITOLOGIA  
 TITULO DE LA TESIS "CARACTERIZACION DE PROTEINAS DE TRYPANOSOMA CRUZI SUSCEP+...  
 TIBLES DE PRODUCIR MODIFICACIONES EN SU CELULA HOSPEDADORA"  
 DIRECTOR/ES DR. D. ANTONIO OSUNA CARRILLO DE ALBORNOZ

TUTOR DRA. D<sup>a</sup> CARMEN MASCARO LAZCANO

TRIBUNAL

PRESIDENTE

VOCALES

SECRETARIO

PEDRO LUIS MATEOS ALARCON  
PAUL DE RYCKE  
JOSE MUEL BARRA MARRAS  
J. LIBORIA SEGURA  
ENRIQUE JAÑEZ PAREJA

Reunido el día de la fecha el Tribunal nombrado para el Grado de Doctor de  
 D. M<sup>a</sup> NIEVES RODRIGUEZ CABEZAS éste  
 procede al acto de mantenimiento y defensa de la Tesis Doctoral.

Terminado dicho acto y contestadas las objeciones formuladas por el Tribunal, éste  
 le calificó APTO CON LAUDE POR UNANIMIDAD

Granada 18 de marzo de 1991  
 El Secretario del Tribunal,

EL PRESIDENTE.

Fdo.: PEDRO LUIS MATEOS ALARCON

Fdo.:

Enrique Jañez Pareja

EL VOCAL.

Fdo.: PAUL H. DE RYCKE

EL VOCAL.

Fdo.: J. M. Barra

EL VOCAL.

Fdo.:

J. L. Segura

---

**UNIVERSIDAD DE GRANADA**  
**FACULTAD DE FARMACIA**  
**DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGIA**

**DIRECTOR:**  
**PROF. Dr. D. ANTONIO OSUNA CARRILLO DE ALBORNOZ**

**TUTORA:**  
**PROF. Dra. Dña. CARMEN MASCARO LAZCANO**

**Tesis presentada para optar al Grado de Doctor en Farmacia por la**  
**Licenciada**  
**MARIA DE LAS NIEVES RODRIGUEZ CABEZAS**

---

**Tesis doctoral**

---

Los trabajos de investigación que se exponen en la presente Memoria titulada **"ESTUDIO Y CARACTERIZACION DE PROTEINAS DE Trypanosoma cruzi SUSCEPTIBLES DE PRODUCIR CAMBIOS EN SU CELULA HOSPEDADORA"**, han sido realizadas en el Laboratorio del Dpto. de Parasitología de la Universidad de Granada, bajo la supervisión de la Profesora Doctora Dña. Carmen Mascaró Lazcano y la dirección del Profesor Doctor D. Antonio Osuna Carrillo de Albornoz.

EL DIRECTOR DEL DEPARTAMENTO  
Fdo.: Prof. Dr. D. FRANCISCO MORILLAS MARQUEZ.

Granada, Febrero, 1991.



---

**DEDICATORIA Y AGRADECIMIENTOS**

---

A mi familia.

A mis amigos.

---

Ma. N. Rodriguez Cabezas

"La más alta sabiduría no tiene sino una ciencia: explicar la creación en su totalidad y el puesto del hombre en la misma".

L. Tolstoy: "Guerra y Paz".



*Quiero dejar constancia de mi más sincero agradecimiento, al Profesor Dr. D. Antonio Osuna Carrillo de Albornoz; su dirección, enseñanzas y apoyo, han hecho posible la realización de este trabajo.*

---

Ma. N. Rodríguez Cabezas

*Al comenzar un trabajo de estas características, todos deseamos escoger un tema que además de su interés, su desarrollo dependa en su mayor parte del tiempo y esfuerzo que dedique el doctorando. Sin embargo, al entrar de lleno en la elaboración del proyecto, somos conscientes de que es imposible funcionar y avanzar sin la colaboración y el apoyo de multitud de personas.*

*Por ello, ahora que damos por finalizado este trabajo que presentamos como Tesis Doctoral -parte de una línea de investigación más amplia- he de expresar mi reconocimiento a aquellos compañeros que a continuación referiré y mi agradecimiento a amigos y familiares, que han demostrado su deseo de colaborar desinteresadamente en cualquier circunstancia.*

*He de manifestar mi agradecimiento al Profesor Dr. Antonio Osuna Carrillo de Albornoz, por su valiosa dirección y colaboración, fundamentales en el diseño del proyecto y realización del mismo. Asimismo, por su magnífica labor en la formación profesional y humana de especialistas y su introducción en el difícil campo de la investigación, sin olvidar los principios humanos esenciales.*

*Quiero destacar a la Profesora Dra. Carmen Mascaró Lazcano, catedrática de Parasitología de la Universidad de Granada, que me ofreció, desde mi primer contacto con la Parasitología, los frutos de sus experiencias y tiempo, mostrando siempre una buena disposición para solucionar los problemas que surgen en las tareas llevadas a cabo en el laboratorio.*

*Asimismo, quiero resaltar el magnífico esfuerzo y colaboración de todos mis compañeros de trabajo, cuya contribución queda reflejada en el contenido de esta Tesis.*

*A mi familia y a Alfonso, que han compartido instantes de alegría y desaliento. Con su cariño y consejos han fortalecido en mí la decisión de seguir adelante, dando en cada momento lo mejor de sí mismos. Quiero resaltar la ayuda de los Prof. Dr. A. Molina Carballo, Prof. Dr. Muñoz Hoyos y la Dra. T. Rodríguez Cabezas cuya contribución queda reflejada en la edición de esta Tesis.*

*Este es realmente un acontecimiento singular en la vida profesional, y soy consciente de su importancia, más que por el hecho del título, porque pienso que cierra una etapa más al conseguir unos objetivos que hace algunos años nos propusimos, y al fin vemos los resultados, gracias a que en todo momento he contado con vuestra orientación, estímulo y ayuda.*



---

## Indice

---

<b>1</b>	<b>INTRODUCCION</b>	<b>1</b>
1	INCIDENCIA DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS.- . . . .	2
2	CICLO BIOLOGICO DE TRYPANOSOMA CRUZI.- . . . .	3
3	PATOLOGIA.- . . . .	3
4	PATOGENESIS.- . . . .	5
	4.1 Origen de la autoinmunidad.- . . . .	7
5	RESPUESTA INMUNE EN LA ENFERMEDAD DE CHAGAS.-	8
6	INMUNOPROFILAXIS EN LA ENFERMEDAD DE CHAGAS.-	9
7	INTERACCION PARASITO / CELULA.- . . . .	12
	7.1 Cooperación Parásito / Célula Hospedadora.- . . . .	17
8	TRANSCRIPTASA INVERSA.- . . . .	19
9	INHIBIDORES DE LA TRANSCRIPTASA INVERSA.- . . . .	23
<b>2</b>	<b>MATERIAL Y METODOS</b>	<b>27</b>
1	MATERIAL BIOLOGICO EMPLEADO.- . . . .	28
	1.1 <i>El parásito: Trypanosoma cruzi.</i> - . . . .	28
	1.2 Células HeLa.- . . . .	29
	1.3 Células Vero.- . . . .	30
2	CULTIVO IN VITRO DE T. CRUZI.- . . . .	31
	2.1 Cultivo de formas epimastigotas.- . . . .	31
	2.2 Cultivo de formas metacíclicas.- . . . .	32
3	CULTIVO DE T. CRUZI EN CELULAS HeLa.- . . . .	32
4	OBTENCION DE FORMAS EPIMASTIGOTAS, METACICLI- CAS Y AMASTIGOTAS DE T. CRUZI.- . . . .	33
	4.1 Cultivo de formas epimastigotas.- . . . .	33
	4.2 Cultivo de formas metacíclicas.- . . . .	34
	4.3 Obtención de formas amastigotas a partir de cultivos celu- lares. . . . .	35
5	OBTENCION DE NUCLEOS DE CELULAS HeLa NO PARASI- TADAS Y PARASITADAS POR T. CRUZI.- . . . .	36
6	DETERMINACION DE LA CANTIDAD DE PROTEINAS.- . .	37
7	OBTENCION DE ANTICUERPOS FRENTE A NUCLEOS DE CELULAS HeLa PARASITADAS POR T. CRUZI.- . . . .	38
	7.1 Preparación de Liposomas.- . . . .	39
	7.2 Inmunización de los ratones.- . . . .	40

---

7.3	Inmunización mediante Coadyuvante de Freund.- . . . .	40
8	TITULACION DEL SUERO ANTI - NUCLEOS DE CELULAS HeLa PARASITADAS POR T. CRUZI.- . . . .	41
9	CROMATOGRAFIA DE AFINIDAD.- . . . .	42
9.1	<i>Obtención de las IgG de suero de ratones inmunizados frente a núcleos de células HeLa parasitadas por T. cruzi mediante una columna de Proteína A - Sepharosa.- . . . .</i>	42
9.2	Formación de una columna de Sepharosa CL4B - IgG. . . .	44
10	OBTENCION DE ANTIGENOS DE NUCLEOS DE CELULAS HeLa PARASITADAS POR T. CRUZI.- . . . .	45
11	ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA.- . . .	46
11.1	Aparato de electroforesis. . . . .	46
11.2	Preparación de los geles. . . . .	46
11.3	Preparación de las muestras.- . . . .	48
12	TINCION DE PLATA PARA LA DETECCION DE POLIPEPTIDOS EN GEL DE POLIACRILAMIDA.- . . . .	49
13	MEDIDA DE LA TRANSCRIPTASA INVERSA.- . . . .	51
14	TECNICAS DE CENTELLEO LIQUIDO.- . . . .	53
15	INHIBIDORES DE LA TRANSCRIPTASA INVERSA.- . . . .	54
15.1	Acción de los inhibidores de la Transcriptasa inversa sobre la reacción "in vitro".- . . . .	54
15.2	<i>Acción de los inhibidores de la Transcriptasa - inversa sobre cultivos celulares infectados por T. cruzi "in vitro".- . . . .</i>	55
16	OBTENCION DE cDNA CON TRANSCRIPTASA INVERSA.- . . .	56
17	ELECTROFORESIS DE AGAROSA.- . . . .	58
18	MARCAJE NO RADIATIVO DE DNA.- . . . .	60
19	LECTURA DEL MARCAJE DE DNA POR DETECCION INMUNOLOGICA.- . . . .	62
20	PRESENCIA DE VIRUS EN T. CRUZI.- . . . .	65
21	TINCION NEGATIVA EN MICROSCOPIA ELECTRONICA.- . . .	66
21.1	Preparación del soporte: Rejillas con Formvar -Carbón.- . . .	66
21.2	Preparación de las muestras.- . . . .	67
21.3	Tinción.- . . . .	68
21.4	Montaje de las muestras en las rejillas y tinción.- . . . .	68
22	DETECCION INMUNOLOGICA DEL VIRUS CON UN SUERO FRENTE A T. CRUZI.- . . . .	68
23	MEDIDA DE LA TRANSCRIPTASA INVERSA EN LA FRACCION OBTENIDA POR ULTRACENTRIFUGACION. . . . .	70
3	<b>RESULTADOS</b> . . . . .	71
3.1	OBTENCION DE NUCLEOS DE CELULAS HeLa PARASITADAS POR T. CRUZI.- . . . .	72

3.2	TITULACION DE LOS DISTINTOS SUEROS ANTINUCLEOS DE CELULAS HeLa PARASITADAS POR T. CRUZI.- . . . .	75
3.3	CROMATOGRAFIA DE AFINIDAD EN COLUMNA DE SEPHAROSA - PROTEINA A.- . . . .	80
3.4	DESARROLLO EN GEL DE SDS- POLIACRILAMIDA DE LAS FRACCIONES OBTENIDAS EN LA SEPARACION DE LAS Ig G DE LOS SUEROS DE LOS RATONES INMUNIZADOS FRENTE A NUCLEOS DE CELULAS HeLa PARASITADAS POR T. CRUZI.- . . . .	82
3.5	CROMATOGRAFIA DE AFINIDAD EN COLUMNA DE SEPHAROSA CL4B - Ig G.- . . . .	84
3.6	DESARROLLO EN GEL DE SDS-POLIACRILAMIDA DE LAS FRACCIONES OBTENIDAS EN LA SEPARACION DE LAS PROTEINAS DE NÚCLEOS DE CELULAS HeLa PARASITADAS POR T. CRUZI POR CROMATOGRAFIA DE AFINIDAD EN UNA COLUMNA DE SEPHAROSA - Ig Gp.- . . . .	87
3.7	MEDIDA DE LA TRANSCRIPTASA INVERSA SOBRE LAS DISTINTAS FRACCIONES DE LOS NUCLEOS DE CélULAS HeLa NO PARASITADAS Y PARASITADAS POR T. CRUZI.- . . . .	90
3.8	MEDIDA DE DNA-POLIMERASAS EN EPIMASTIGOTES, METACICLICOS Y AMASTIGOTES DE T.CRUZI.- . . . .	91
3.9	CRCMATOGRAFIA DE AFINIDAD SOBRE LA COLUMNA DE SEPHAROSA - Ig Gp DE LOS EXTRACTOS DE EPIMASTIGOTES, METACICLICOS Y AMASTIGOTES DE T CRUZI.- . . . .	92
3.10	MEDIDA DE LA TRANSCRIPTASA INVERSA EN PRESENCIA DE LOS INHIBIDORES DE LA MISMA: SURAMINA SODICA Y ddCTP.- . . . .	94
3.11	TRATAMIENTO IN VITRO DE CELULAS HeLa INFECTADAS CON T.CRUZI CON LOS INHIBIDORES DE LA TRANSCRIPTASA INVERSA: SURAMINA SODICA Y ddCTP.- . . . .	95
3.12	OBTENCION DE cDNA.- . . . .	105
3.13	ELECTROFORESIS DE AGAROSA PARA LA DETECCION DEL cDNA.- . . . .	108
3.14	MARCAJE DE cDNA DE FORMA NO RADIATIVA.- . . . .	110
3.15	PRESENCIA DE VIRUS EN T. CRUZI.- . . . .	113

---

3.16	DETECCION INMUNOLOGICA DEL VIRUS CON UN SUERO FRENTE A T. CRUZI.- . . . .	115
3.17	MEDIDA DE LA TRANSCRIPTASA INVERSA EN LA FRACCION OBTENIDA POR ULTRACENTRIFUGACION.- . . . .	118
4	DISCUSION.-	119
5	CONCLUSIONES	145
6	BIBLIOGRAFIA	147

---

## INTRODUCCION

---

---



## 1 INCIDENCIA DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS.-

*Trypanosoma cruzi* es un protozoo hematozoario perteneciente a la Familia *Trypano. omatidae*, descubierto por Carlos Chagas en 1909 mientras se realizaba un estudio epidemiológico realizado sobre Paludismo en Minas Gerais (Brasil).

Es el responsable etiológico de la Trypanosomiasis americana o Enfermedad de Chagas, enfermedad que afecta a unos 14 millones de personas, en un area geográfica tan extensa como la comprendida entre el Sur de USA hasta el sur de Argentina.

Se considera la endemia parasitaria más peligrosa y extendida en el continente americano. Se estima que, aproximadamente unos 65 millones de personas están expuestos al contagio de la enfermedad (PHAO, 1982; Brener, 1982; Miles, 1983; OMS, 1985).

Los últimos datos epidemiológicos revelan que la enfermedad, considerada como una enfermedad rural hasta hace muy poco tiempo, se encuentra en vías de expansión gracias a las migraciones periódicas a los centros urbanos y a la utilización de otras vías de transmisión (no las habituales en el ciclo biológico: transmisión sexual, transmisión por bancos de sangre...), estimándose tan sólo que en Brasil hay unos 850.000 casos anuales como consecuencia de la transmisión sanguínea (Walsh, 1984).

Dado que no existe actualmente quimioterapia ni inmunoprofilaxis, o quimio-profilaxis eficaz, el problema aumenta de magnitud.

De esta manera, los estudios seroepidemiológicos muestran que un 8% de la población latinoamericana tienen anticuerpos anti *Trypanosoma cruzi*, encontrándose tasas de parasitación auténticamente desorbitadas en Bolivia, con un 43% de la población, Venezuela y Argentina, con un 10%, 8 % en Brasil, 14% en Chile (PHAO, 1989), pudiéndose atribuir el 5% de la muerte de Brasil a esta enfermedad.

Estos datos, unidos a que no existe un método de diagnóstico específico de la enfermedad, ni un método de prognosis de la misma, dificultan los estudios de lucha epidemiológica, especialmente en los bancos de sangre (Pereira, 1984).

## 2 CICLO BIOLÓGICO DE *TRYPANOSOMA CRUZI*.-

El ciclo biológico completo fue detallado por Dias en 1934. Consta de dos etapas claramente definidas: una en el hospedador intermediario y vector, y otra, en el mamífero que actúa como reservorio.

Los insectos vectores, pertenecientes a la familia *Reduviidae*, ingieren las formas tripomastigotas sanguíneas al succionar la sangre de mamíferos infectados.

En el interior, y a lo largo del tubo digestivo, el parásito sufre una serie de diferenciaciones, encontrándose en el intestino medio bajo la forma epimastigota, que se multiplica activamente, y en el recto se diferencia a formas tripomastigotas metacíclicas.

Estas, al salir con las heces de los insectos vectores, al defecar éste durante la picadura en el hospedador mamífero, penetran por cualquier punto de discontinuidad de la piel, introduciéndose en las células de la epidermis, células de la mucosa o células linfoides (macrófagos) que acuden al lugar de la picadura.

Allí, en el interior del citoplasma celular, se transforman nuevamente a formas amastigotas, que se dividen activamente por fisión binaria, ocupando todo el citoplasma celular, y tras una nueva transformación en formas tripomastigotas, salen al exterior invadiendo el espacio intercelular y el torrente circulatorio, para de nuevo, cerrar el ciclo exógeno o el ciclo dentro del hospedador mamífero.

## 3 PATOLOGÍA.-

La OMS y la OPS (Organización Panamericana de Salud) en 1974, llegan a la conclusión de que el término "Enfermedad de Chagas" comprende dos procesos patológicos diferentes: La "Enfermedad de Chagas" propiamente dicha, la cual presenta una fase aguda septicémica que evoluciona hasta fase crónica y las "patías chagásicas", resultantes de las secuelas producidas durante la fase aguda de la infección.

- (i) En la fase aguda de la enfermedad predomina un estado febril inicial, que desaparece, y una serie de patías del miocardio, aunque también se pueden

dar lesiones inflamatorias focales por presencia del parásito en el músculo esquelético y liso, células nerviosas, fibroblastos y ocasionalmente, células epiteliales.

Si el grado de parasitación, y consecuentemente de inflamación, es intenso, la necrosis de las fibras contráctiles del miocardio y del tejido conectivo, pueden llevar a un infarto agudo, algún tipo de bloqueo cardiaco (Andrade y Andrade, 1980) y a veces a un fallo cardiaco (Andrade y col. 1978).

La destrucción del miocardio está directamente relacionada con la presencia del parásito, pero, en el desarrollo de la fase aguda, aparecen focos inflamatorios más difusos con edemas y necrosis en zonas donde no existen células parasitadas.

La necrosis se puede extender al músculo cardiaco y tejido conectivo envolviendo las neuronas de los ganglios cardiacos y otras neuronas periféricas, en particular el plexo de Auerbach en el tracto digestivo.

La dinámica y las alteraciones morfológicas dependen de la intensidad de la enfermedad. Si no es severa, desciende el número de parásitos al final de la fase aguda, la infiltración celular decrece y retornan las funciones normales.

La mortalidad en la fase aguda es menor del 10%, dándose específicamente en niños, los cuales mueren debido a meningoencefalitis, fallo cardiaco y bronconeumonias no específicas.

- (ii) Patología del estado crónico: Se caracteriza por disturbios cardiacos y gastrointestinales. Las anomalías en el corazón, incluyen palpitaciones recurrentes y cambios en el ECG con insuficiencia cardiaca y agrandamiento del corazón (Texeira, 1979).

La miocarditis e inflamación son evidentes, con un característico infiltrado linfoide, llegando a incrementarse el número de espacios intersticiales con reducción de la capacidad de difusión del oxígeno (Anselmi y col., 1966). Se produce una fibrosis que envuelve la fibra cardiaca.

Como consecuencia del cambio de contractibilidad de las fibras cardiacas, se reduce el volumen/latido, el gasto cardiaco y las cámaras cardiacas pueden

mostrar una dilatación asociada en un intento de compensar la destrucción del músculo cardiaco.

Se producen cambios en la conductividad eléctrica, envolviendo preferencialmente a la rama del haz derecho (Andrade y col.,1978) con un bloqueo ocasional completo del atrio ventricular.

Frecuentemente aparece un aneurisma apical ventricular que se considera como la mayor característica patognomónica de la cardiopatía de la fase crónica de la enfermedad de Chagas.

Cabe destacar, que estos cambios patológicos son debidos a un progresivo proceso inflamatorio, se presentan con una ausencia virtual de parásitos y son similares a las lesiones inflamatorias en el tracto digestivo y sistema nervioso central.

Se producen megaformaciones, generalmente del esófago y colon, hipertrofias de algunas regiones intestinales como consecuencia de las denervaciones de los ganglios de los plexos mesentéricos, dando lugar a una reducción del peristaltismo y acumulación del contenido en el colon (Borehan, 1979).

El grado de la patología de la fase crónica varia dependiendo del area geográfica. Así por ejemplo, en Colombia y Venezuela, la fase crónica es usualmente asintomática y solo ocasionalmente acompañada por pequeñas cardiopatías, mientras que en regiones de Brasil, predominan manifestaciones digestivas y/o cardíacas.

#### 4 PATOGENESIS.-

Cabría pensar que el daño ocasionado en la fase aguda está directamente relacionado con la destrucción celular producida por el parásito, pero existen zonas con lesiones donde no se encuentra este protozoo.

El edema intersticial puede reducir la capacidad de difusión del oxígeno y crear suficientes condiciones de anoxia que causen la muerte celular. Sin embargo, los estudios realizados por Anselmi y col (1966), muestran que la intensidad del daño cardiaco es mayor del que se produciría por este mecanismo.

Estudios realizados "in vitro" muestran que los antígenos excretados por *T. cruzi* después de la interacción parásito - célula se asocian a la membrana de las células infectadas y no infectadas (Ribeiro dos Santos y Hudson, 1980 a; Ortega-Torres, 1982), sensibilizando al hospedador para un proceso de autólisis celular debido a la respuesta inmune (Ribeiro dos Santos y Hudson, 1980 b).

Si este mecanismo operase "in vivo", se podría explicar el daño existente en lugares diferentes al inicial de la infección.

La patogénesis de la fase crónica es más problemática. El daño tisular parece asociado con infiltrados celulares, generalmente con ausencia del parásito. Se han propuesto algunos mecanismos para explicar el desarrollo de las lesiones crónicas:

- (i) La excreción de toxinas por el parásito podrían ser la causa del daño neuronal (Köberle, 1970; Castanys y col. 1990).
- (ii) La hipersensibilidad a productos del parásito produciría la inflamación y subsecuentemente el daño tisular (Muñiz y Azevedo, 1947).
- (iii) Evolución de una respuesta autoinmune como respuesta a las interacciones parásito-célula (Hudson, 1983).

Según Hudson y Britten (1985), las primeras posibilidades carecen de consistencia debido a inexistencia del parásito en muchas lesiones crónicas, pero un mecanismo autoinmune sería consecuente con las investigaciones desarrolladas hasta el momento.

La intensidad de la parasitación y la severidad de la enfermedad tiene una correlación negativa en la fase crónica de la enfermedad. Los pacientes desarrollan una inmunidad efectiva contra la infección pero son vulnerables a los mecanismos responsables de la patogenicidad en la fase crónica.

Los autoanticuerpos EVI (Endotelial, Vascular, Intersticial) son los primeros indicadores de una autoinmunidad en la infección por *T. cruzi*.

Estos anticuerpos se unen al miocardio, estructuras vasculares y a las células intersticiales del músculo cardíaco (Cossio y col., 1974). Los autoanticuerpos están presentes tanto en la fase aguda como en la crónica.

Szarfman y col. (1982), sugieren que la producción de estos anticuerpos está más relacionada con los antígenos del parásito que con los productos liberados por la degradación celular. Estos autores, muestran que estos anticuerpos reconocen la laminina del hospedador y una pseudo-laminina en *T. cruzi*.

En experimentos con sueros de chagásicos, se han identificado Ig M e Ig G que se ligan a la laminina en tejidos conectivos pero no al colágeno, fibronectina, condronectina o procolágeno. Estos anticuerpos se unen fuertemente a las formas tripomastigotas y amastigotas del parásito.

Szarfman propone que los autoanticuerpos EVI y PN (Periferal Nerve), están producidos por una respuesta del hospedador a la molécula similar a la laminina existente en el parásito.

El papel de los autoanticuerpos en la producción del daño en los tejidos del hospedador no está claro.

Los anticuerpos EVI pueden actuar como agonistas  $\beta$  - adrenérgicos, ya que preparados de rata muestran cambios en el sarcolema y un incremento en la frecuencia y contracción en presencia de estos autoanticuerpos.

Además, los efectos inotrópico y cronotrópico positivos de estos anticuerpos, se pueden bloquear con antagonistas  $\beta_1$ , pero no con  $\beta_2$  (Sterin-Borda y col., 1976).

Experimentos con células infectadas y sanas de corazón fetal humano marcados con  $^{51}\text{Cr}$ , muestran que pueden ser lisados por linfocitos de pacientes chagásicos.

Los linfocitos del estado agudo son más citotóxicos que los del estado crónico y ambos, significativamente más activos que los linfocitos control (Texeira y col., 1978).

Un trabajo realizado por Ribeiro dos Santos y Hudson (1980 a y b), muestra que los linfocitos de la fase crónica en ratón pueden matar células musculares no sensibilizadas por antígenos del parásito, mientras que linfocitos de animales en fase aguda solo matan células sensibilizadas o infectadas.

#### 4.1 Origen de la autoinmunidad.-

La denervación del tejido nervioso central o periférico es lo más destacado en la inducción de la fase crónica de la enfermedad de Chagas.

Ribero dos Santos y Hudson (1981) proponen que los antígenos del parásito se adsorben en las células no infectadas, seguido de la liberación de los parásitos y antígenos durante la ruptura celular, produciendo una autoinmunidad.

Se conoce que los antígenos propios del hospedador son inmunogénicos en numerosas infecciones virales y bacterianas produciendo un estado hiperreactivo similar al que se desarrolla durante la infección por *T. cruzi*.

Alternativamente, los conjugados de antígenos propios y del parásito liberados por la célula destruida, podrían actuar como un hapteno.

Sin embargo, esta posibilidad requiere experimentos que la apoyen, tales como los realizados en procesos de autoinmunidad en encefalomiелitis alérgica, donde linfocitos T específicos frente a mielina, producen una patología de autoinmunidad alérgica cuando son inoculados en animales sanos (Ben-Nun y Lando, 1983).

## 5 RESPUESTA INMUNE EN LA ENFERMEDAD DE CHAGAS.-

La infección con *T. cruzi* produce una respuesta inmune elevada tanto humoral como celular (Brener, 1980). Han detectado anticuerpos citolíticos para las formas tripomastigotas sanguíneas en los sueros de enfermos cuando se emplea la técnica de lisis mediada por complemento (LMC).

Cuando un grupo de pacientes se tratan con Nifurtimox o Benzonidazol (fármacos empleados en la terapia frente a esta enfermedad) durante períodos prolongados de tiempo, aparece un porcentaje elevado de negatividad para la LMC, pero la serología sigue siendo positiva (Kretti y Brener, 1982). Los sueros LMC (-) no precipitan un polipéptido del parásito 160 KD al contrario de lo que sucede con los LMC (+).

Cuando se inicia la infección, la inmunidad depende de los linfocitos T y por lo tanto mediada por macrófagos (Trischmann, 1983). Después de tres o más semanas de infección, se desarrollan anticuerpos frente a la transferencia pasiva (Scott, 1981).

La infección aguda experimental produce una fuerte deplección de la población linfoide que se expresa como una inmunodepresión "in vivo" (Cunningham y col.,

1978) y a los mitógenos "in vitro" (Kierszenbaum y Budzco, 1982).

Se sabe sin embargo, que el grado de inmunodepresión no es crucial en la variación de la susceptibilidad a la infección, así por ejemplo, los ratones de la cepa C57B1/6 (resistentes) y CH3 (susceptibles), muestran un grado comparable de la disminución de la respuesta a antígenos.

Se asume, que esta inmunodepresión es un simple reflejo del estado fisiológico por el stress inicial producido en el proceso infeccioso después de la aparición de formas tripomastigotas sanguíneas, se incrementa la Ig M y la respuesta mitogénica.

No existen evidencias de una regulación de la respuesta inmune por linfocitos T supresores durante la fase aguda, sin embargo, los macrófagos y los factores séricos que restringen el complejo mayor de histocompatibilidad (MHC), se han mostrado como depresores de la respuesta inmune (Cunningham y col., 1978).

Los linfocitos T supresores (fenotipo Thy 1.2) aparecen durante la fase crónica de la enfermedad siendo capaces de regular la respuesta Ig G así como la hipersensibilidad retardada (Reed y col., 1983).

## 6 INMUNOPROFILAXIS EN LA ENFERMEDAD DE CHAGAS.-

El diagnóstico de la enfermedad de Chagas es difícil debido a la escasez de parásitos en sangre, por la baja prevalencia de los signos clínicos, por el lento desarrollo de la enfermedad y por las limitaciones económicas de los países y zonas afectadas.

En las zonas más privilegiadas no endémicas, la tripanosomiasis se considera importada, exótica y su etiología no es normalmente diagnosticada.

La transmisión a humanos se efectúa esencialmente por vectores domiciliarios como *Rhodnius prolixus*, *Triatoma infectans* y *Eutriatoma*, en un habitat socio-culturalmente bajo y pobre. Su control depende de la mejora de las condiciones socioeconómicas, especialmente vivienda, y voluntad política (Dias y Dias, 1979; Haddock, 1979).

Aparte de esto, se producen transmisiones por infecciones congénitas y por



transfusiones sanguíneas, más del 50% en zonas endémicas (Cerisola y col., 1972).

Como antes hemos mencionado, solo el Nifurtimox y el Benzonidazol son usados en el tratamiento de la enfermedad de Chagas.

Ambos fármacos requieren períodos prolongados de tiempo de administración induciendo efectos colaterales como reacciones de hipersensibilidad, neuritis peririférica, disminución de peso y trastornos gastrointestinales.

Los enfermos tratados con Benzonidazol, pueden presentar una disminución marcada en el número de leucocitos. La eficacia de estos fármacos es baja y solo un pequeño porcentaje de pacientes se curan (Brenner, 1984).

El fracaso en las medidas de control del vector así como la escasa fiabilidad en el tratamiento quimioterápico, ha llevado a la búsqueda de una vacuna contra esta enfermedad.

Brenner y Camargo (1982) postulan la idea de que una vacuna frente a la enfermedad de Chagas debe tener las siguientes características:

- (i) No debe producir infección.
- (ii) Debe conferir una protección total.
- (iii) No debe inducir procesos autoinmunitarios.
- (iv) No debe producir inmunosupresión.

Estos autores sugieren que los antígenos de superficie del parásito son buenos candidatos para la obtención de anticuerpos protectivos.

En 1981, Bertolini extrajo RNA inmune desde bazo de ratones infectados con *T. cruzi*. Este RNA se ensayó como antígeno en el test de la inhibición de macrófagos *in vitro*, y se vio que podía convertir células de ratones no sensibilizados en macrófagos sensibilizados a antígenos de *T. cruzi*.

En 1982 De Lucca y col. vieron que este RNA confería una protección significativa frente a la infección con *T. cruzi* en ratones, lo que evaluaron mediante el

estudio de la parasitemia y de la supervivencia en ratones infectados con la cepa Y de *T. cruzi*.

En 1986, el equipo de Bertolini compara el efecto de RNA aislados de ratones normales (nRNA) y ratones infectados (iRNA), estudiando como los macrófagos peritoneales de ratón expuestos al iRNA muestran un aumento de la resistencia a este parásito.

Así mismo ven que el Poly(A) contenido en el iRNA es la fracción activa, y no encontrándose actividad en macrófagos incubados con RNA de ratones normales (nRNA) o con Poly(A) sintético.

Scharfstein y col. (1983) aislaron una glicoproteína de superficie de 25 kD presente en todos los estadios del ciclo del parásito. Esta proteína es reconocida por el 96% de los enfermos.

Sin embargo, la inmunización con esta glicoproteína no reduce la parasitemia ni previene del desarrollo del estadio crónico de la enfermedad.

Snary (1983) utiliza dos glicoproteínas purificadas de la superficie del parásito como antígenos; una glicoproteína de 90 kD de todas las formas del parásito, y otra de 72 kD restringida a las formas epimastigotas y metacíclicas.

La inmunización de ratones con la proteína de 72 kD reduce la parasitemia y aumenta la supervivencia con relación a los controles, pero no previene de infecciones con formas tripomastigotas sanguíneas. Los ratones vacunados con la proteína de 90 kD sobreviven a la infección pero no se reduce en ellos totalmente la parasitemia.

Scott y col (1985), inmunizan animales con la glicoproteína de 90 kD mostrando una protección parcial frente a las infecciones con formas tripomastigotas, ya que el xenodiagnóstico de los mismos daba positivo tras 60 semanas de la infección.

Andrews y col. (1985) vacunaron ratones con tripomastigotas de cultivo tratados con 8-metoxi-psoralen. Todos los ratones sobreviven a la infección y no detectan parásitos en sangre. Sin embargo, algunos ratones dieron positivo en hemocultivo.

Estos resultados no difieren cualitativamente de los obtenidos con otros agentes inhibidores de la proliferación del parásito, Actinomicina D o tratados con rayos X (Brener y Camargo, 1982).

Por otro lado, los autores remarcan que el suero de los ratones vacunados muestra capacidad lítica en el test de LMC.

## 7 INTERACCION PARASITO / CELULA.-

El proceso de penetración de *T. cruzi* en su célula hospedadora envuelve una adhesión inicial del parásito en la superficie celular seguida de su interiorización.

El mecanismo de entrada de este parásito es similar al de los merozoitos y esporozoitos de *Plasmodium sp.* en los eritrocitos (Ladda y col., 1969; Danforth y col., 1980), *Toxoplasma gondii* en macrófagos y fibroblastos (Jones y Hirsch, 1972; Jones y col., 1972) y *Leishmania sp.* en macrófagos (Alexander, 1975; Chang y Dwyer, 1978).

El tratamiento con Tripsina y Quimiotripsina de los macrófagos, inhibe completamente la adherencia y penetración de las formas epimastigotes y tripomastigotas de *T. cruzi*, lo cual indica la existencia de receptores sensibles a proteasas en la membrana plasmática de la célula hospedadora (Osuna y col., 1985).

Los receptores para la Fc o C3b no son esenciales para la captación del parásito por los macrófagos.

El tratamiento con Citochalasina B bloquea el proceso de entrada del parásito en los macrófagos (Nogueira y Cohn, 1976). Una revisión profunda del mecanismo de entrada y el papel que juega el citoesqueleto del parásito y de la célula hospedadora, ha sido recientemente publicada por Osuna y col. 1990.

Las formas epimastigotas no son capaces de penetrar en células no fagocíticas tales como HeLa, células L, Vero y fibroblastos de embrión y otras células no fagocíticas.

En los macrófagos, estas formas son destruidas y digeridas por los fagolisosomas, mientras que las formas tripomastigotas escapan de la vacuola fagocítica y se multiplican en la matriz citoplasmática como forma amastigota.

Estas formas son capaces de interiorizarse en macrófagos y multiplicarse activamente en el interior e incluso, son infectivos para animales de experimentación (Umezawa y col., 1985).

De igual manera, existen evidencias de que las glicoproteínas de la superficie del parásito están involucradas en el proceso de interiorización en su célula hospedadora.

Cuando las formas tripomastigotas son tratadas con Tripsina, Papaina o Colagenasa, pierden la capacidad infectiva (Colli y col., 1984; Osuna y col., 1985). La adición de tunicamicina bloquea la interiorización (Zingales y col., 1985; Osuna y col., 1985).

Así mismo, se requiere una síntesis de proteínas por parte del parásito para la invasión de la célula. Al tratar las formas tripomastigotas con Cicloheximida se reduce la interiorización del parásito (Osuna y col., 1985).

Concentraciones de producto que inhiben en un 90% la síntesis de proteínas, inhiben la entrada del parásito en un 80% (Zingales y col., 1985).

Lima y Kierszanbaum (1982) estudian el efecto de la Pactamicina, inhibidor irreversible de la síntesis de proteínas, en la interacción de *T. cruzi* con su célula hospedadora. Se produce una inhibición de la adherencia y penetración, así como, la infectividad en ratón de las formas tripomastigotas.

La adición de Puromicina, Tunicamicina o Actinomicina inhiben la capacidad infectiva. Sin embargo, esta última estimula la adherencia del parásito sobre la superficie celular.

Estos resultados sugieren que la adhesión y penetración son procesos independientes y que este último proceso está mediado por la presencia de receptores N-acetilglicosilados (Piras y col., 1983; Osuna y col., 1984 b).

Se ha demostrado que el parásito interacciona con la superficie de la célula mediante una unión receptor-ligando. En base a ello, se ha postulado que la adherencia y penetración están mediadas por componentes del parásito y la célula hospedadora (Andrews y Colli, 1982; Piras y col., 1983; Vllalta y Kierszenbaum, 1983, 1984; Mereilles y col., 1984; Piras y col., 1985).

Dvorak y Crane (1981), Osuna y col., (1984 b), deducen que la infección de las células por *T. cruzi* se ve incrementada al final de la fase S del ciclo celular, por el hecho de que durante la fase S del ciclo celular, la célula hospedadora expresa una concentración alta de componentes de superficie los cuales pueden actuar como receptores para la internalización del parásito.

El tratamiento de células Vero con las lectinas Con A, Aglutinina de germen de trigo, Fitoheماغlutinina y Ricina I, da lugar a una inhibición en el proceso

de interiorización del parásito (Piras col., 1983).

Similares efectos se obtienen cuando la célula hospedadora se trata con sustancias que afectan al citoesqueleto celular (Piras y col., 1980; Henriquez y col., 1981; Gamarro, 1983).

El tratamiento de macrófagos de ratón o mioblastos de rata con alfa-manosidasa da lugar a un descenso significativo de la interiorización de las formas tripomastigotas sanguíneas y maticíclicas (Villalta y Kierszanbaum, 1983).

Por otra parte, recientemente se ha descrito que la Fibronectina, glicoproteína de alto peso molecular presente en la sangre, tejido conectivo y superficie celular, se une a las formas tripomastigotas del parásito.

La adición de anticuerpos antifibronectina al medio de cultivo, inhibe significativamente la infección de los fibroblastos, lo que indica que la fibronectina puede actuar como un receptor para la unión de *T. cruzi* a la superficie celular (Ouassi y col., 1984; Ouassi y col., 1985).

Todas estas observaciones, sugieren que las glicoproteínas de superficie y el citoesqueleto de la célula hospedadora juegan un papel fundamental en la interiorización del parásito.

En un intento de identificación de los carbohidratos involucrados en el proceso de infección, se han realizado estudios en los que el parásito y/o la célula hospedadora se incuban con monosacáridos. La N-acetil-D-glucosamina (GLcNAc) inhibe significativamente la infección en células HeLa, LLC-MK2 o BESM con formas tripomastigotas (Crane y Dvorak, 1982; Colli y col., 1984).

Estos datos sugieren la existencia de una lectina en la superficie de *T. cruzi* capaz de reconocer los receptores celulares que contienen residuos de GLcNAc. Csete y col. (1985) han confirmado esta hipótesis al encontrar una proteína en el medio de cultivo de las formas tripomastigotas capaz de interactuar con GLcNAc ligada a una columna de Sepharosa CL 4B.

Mediante cromatografía de afinidad, se ha aislado una glicoproteína PG 85 específica de formas tripomastigotas (Katzin y Colli, 1983). Anticuerpos frente a glicoproteínas de las formas tripomastigotas con residuos GLcNAc inhiben la interiorización del parásito en células LLC-Mk2.

Algunos de los antígenos de superficie del parásito poseen naturaleza enzimática. La presencia de proteasas en la superficie del parásito fué estudiada por Krettli y Eisen (1980), Rangel y col. (1981).

En recientes estudios (Pereira, 1983 a; Libby y col., 1986), se ha demostrado que las formas tripomastigotas sanguíneas y procedentes de cultivos celulares, tienen una actividad neuroaminidasa 6-15 veces mayor a la de las formas obtenidas en medios axénicos, mientras que las formas amastigotas carecen de esta actividad.

La neuroaminidasa de *T. cruzi* produce una desialinización de las células miocárdicas así como de las células del epitelio de las venas safenas. Los autores sugieren que estas alteraciones pueden jugar un papel importante en la interacción parásito-célula hospedadora (Andrews y col., 1982).

El mecanismo por el cual los parásitos intracelulares escapan a la acción de los enzimas lisosomales es desconocido en muchos aspectos. En algunos casos como *Toxoplasma gondii* y *Mycobacterium tuberculosis*, la fusión lisosomal está disminuida o ausente (Endo y col., 1982; Gordon y col., 1980).

En otros organismos como *Mycobacterium lepraemurium* y especies de *Leishmania* (Draper y Rees, 1970; Lewis y Peters, 1977), se produce la fusión lisosomal, pero son capaces de sobrevivir en el interior del fagolisosoma.

*T. cruzi*, una vez que ha penetrado en la célula es capaz de atravesar el fagolisosoma y transformarse a amastigota en el citoplasma (Nogueira y Cohn, 1976). Sin embargo, mientras reside en el fagosoma, las formas metacíclicas de este parásito son capaces de inhibir la fusión lisosomal (Osuna y col., 1986).

*Leishmania* excreta carbohidratos capaces de inferir al parásito una protección frente al ataque de los enzimas lisosomales (Walter y col., 1982; Eilman y col., 1985). Así por ejemplo, los factores excretados son capaces de inhibir la fosfatasa ácida,  $\beta$ -glucuronidasa,  $\beta$ -galactosidasa y N-acetil- $\beta$ -glucosaminidasa (El-On y col., 1980).

Se conoce poco acerca de los mecanismos moleculares involucrados en el desarrollo del parásito en el interior de su célula hospedadora. Bhattacharya y Janovy (1975), utilizando precursores radiactivos demuestran como entre *Leishmania donovani* y macrófagos peritoneales existe un intercambio bidireccional de macromoléculas entre ambos organismos.

Hay muchos estudios sobre la caracterización de virus en protozoos parásitos. Wang y Wang (1986 a) estudiaron la presencia de un RNA virus de doble cadena en *Giardia lamblia*. Otro RNA virus de doble cadena, se ha asociado a otro protozoo parásito, *Trichomonas vaginalis*, (Wang y Wang (1986 b).

Este virus tiene un genoma viral de 5 Kb aproximadamente. Recientemente,

Stuart y col. (1988), observaron una infección viral en un aislado de *Leishmania*, y lo denominaron virus LR1 de origen desconocido.

Giovanni Widmer y col. (1989), realizaron un screenig de series de aislados del protozoo *Leishmania (L. braziliensis guyanensis)*, para averiguar la existencia de virus. El procedimiento empleado se basa en un análisis enzimático desarrollado para RNA polimerasas virales dependientes de RNA.

Simultaneamente, las preparaciones de ácidos nucleicos totales del promastigote, se analizaron para comprobar la presencia del genoma viral o de transcritos. Finalmente con observaciones a microscopía electrónica, afirmaron la presencia de RNA virus en estos aislados de *Leishmania*.

De Luca y col. (1978), utilizando la técnica de migración de los macrófagos, observan que los RNA-polisomales de células de bazo de ratones infectados por *T. cruzi*, sensibilizan los linfocitos humanos, mientras que el RNA de bazo de ratones no infectados no produce inhibición en la migración de los macrófagos.

Aparte de esta comunicación a nivel macromolecular, la célula infectada sufre unos cambios metabólicos que pueden favorecer el desarrollo del parásito a expensas de los nutrientes que aporta la célula. *Plasmodium sp.* es capaz de permeabilizar su célula hospedadora.

Los eritrocitos infectados incorporan mayor cantidad de calcio (Leida y col., 1981; Krungkrai y Yuthavong, 1983), se produce un aumento de la permeabilidad para la glucosa, glicina, isoleucina, glutamato, etc. (Ginsburg y col., 1983; Elford y col., 1985; Castanys y col. 1990).

Los factores excretados por *Leishmania sp.* producen un incremento en el influjo de calcio en los macrófagos infectados, lo cual según Eilam y col. (1985) protegería al parásito de la acción de los enzimas lisosomales por la gran capacidad de unión del calcio a estos factores excretados. *T. cruzi* produce un incremento en la concentración de calcio libre citoplasmático en la célula parasitada (Gamarro, 1983; Osuna y col., 1990).

Chess y col. (1983) sugieren que las formas tripomastigotas de *T. cruzi* son capaces de incorporar componentes de la célula hospedadora, pudiendo utilizar este recubrimiento de antígenos como mecanismo de evasión de la respuesta inmune.

La mayoría de los autores piensan que los antígenos adquiridos por el parásito o bien proteínas propias similares a las del hospedador, podrían jugar un papel importante en la inmunopatogénesis de la enfermedad de Chagas en pacientes crónicos.

### 7.1 Cooperación Parásito / Célula Hospedadora.-

Si bien se sabe que existe una cooperación parásito - célula en los procesos de interacción e interiorización de *T. cruzi*, se conoce muy poco acerca de los mecanismos bioquímicos de regulación de estos procesos.

Anteriormente a este trabajo, en nuestro laboratorio se realizaron una serie de experiencias con cultivos celulares infectados con formas metacíclicas de *T. cruzi* marcadas con Leucina  $^3H$ , Uridina  $^3H$  y Timidina  $^3H$  (Jimenez-Ortiz, 1981).

Cuando se emplearon formas metacíclicas marcadas con Timidina  $^3H$ , se dedujo que el DNA marcado del parásito permanece estable en todo momento, dado que durante el transcurso de las experiencias no se apreció un desmarque del mismo.

Sin embargo, cuando los cultivos celulares se infectaron con formas metacíclicas marcadas con Uridina  $^3H$ , los resultados obtenidos mostraron que a las 4 horas de la parasitación, el 100% de las células parasitadas poseen marcas concentradas sobre los amastigotas. Pero, a las 7 horas se apreció que en el 22.6% de las células parasitadas comenzaban a aparecer "cursos" de granos en el citoplasma con dirección hacia el núcleo.

A las 22 horas de cultivo, el 100% de las células tienen marcas dispersas en el núcleo, nucleolos y citoplasma, apareciendo los parásitos desmarcados. De estos resultados se deduce que el parásito envía, de alguna manera, una señal constituida en parte por RNA (marcado en este caso con Uridina  $^3H$ ) al núcleo y nucleolos de la célula parasitada.

La captación por parte de la célula de Uridina  $^3H$  no puede proceder del RNA del parásito que se cataboliza, ya que el medio que circunda a las células parasitadas tiene una concentración de análogo sin marcar 400 veces superior a la que se utilizó para marcar el parásito.

Debemos suponer que el material radiactivo que pasa al interior del núcleo celular, son moléculas de RNA del parásito y no moléculas provenientes del catabolismo de éste, dado que sólo las moléculas de RNA, son capaces de producir marcas, ya que los nucleótidos y nucleósidos libres son eliminados en el proceso de fijación de la célula (Cleaver, 1967).

Cuando las formas metacíclicas se marcaron con Leucina  $^3H$  y posteriormente se inocularon en cultivos celulares, se encontraron fenómenos similares a los observados cuando se marcaron con Uridina  $^3H$ .



Así parece pues, que el parásito en las primeras horas de la parasitación envía una RNA - proteína al núcleo de la célula y que únicamente tras la metabolización de estas macromoléculas, se produce la estimulación en la síntesis de DNA celular y posteriormente en la del RNA.

Así se pensó, que posiblemente de esta manera el parásito influye en el metabolismo nuclear de la célula hospedadora o quizás que, al igual que algunos virus, utilice la maquinaria nuclear de la célula para que se sintetice RNA que luego podría ser leído (en el caso del parásito) en sus propios ribosomas.

También se vió mediante experimentos con células enucleadas y células tratadas con Actinomicina D, que los amastigotes eran incapaces de multiplicarse, al igual que en células enucleadas (Osuna y col., 1984 b) aunque sí emiten al citoplasma circundante RNA - proteínas marcadas. Esto nos indicaría que el parásito para multiplicarse en el interior de la célula necesita que el núcleo de ésta se encuentre en perfecto estado de funcionamiento.

Con todo esto se puede deducir que el metabolismo intracelular de *T. cruzi* es complejo, existiendo una estrecha relación entre el metabolismo nuclear de la célula hospedadora y el parásito; estando condicionada esta interrelación metabólica a un intercambio de macromoléculas entre parásito y célula hospedadora y a la inversa. Quizás el parásito aprovecha totalmente a la célula para acelerar su propia multiplicación intracelular.

Por otra parte, podría tratarse de un mecanismo de evasión de la respuesta inmune por parte del parásito que rodeándose de ciertos antígenos de superficie, similares a las de las células, evitaría ser reconocido por el sistema inmunológico del hospedador.

Sería por tanto, un fenómeno similar, aunque algo más complejo, al demostrado para *Schistosoma mansoni* (Celgg y col., 1971) en el que este se rodea de glicoproteínas similares a las de los grupos sanguíneos del hospedador, o quizás a un fenómeno parecido al descrito por Helenius y col., 1978 para el virus S.F.V. (Semliki Forest Virus) en el que la partícula viral se rodea de antígenos de histocompatibilidad, en la fase de penetración en el citoplasma celular, actuando este antígeno como receptores para dichos virus.

## 8 TRANSCRIPTASA INVERSA.-

La transcriptasa inversa fué descubierta por Temin y Mizutani en 1970.

Es un enzima que transcribe RNA a DNA. Los virus que contienen dicho enzima reciben el nombre de Retrovirus. Estos tienen un genoma de RNA, que transcrito a DNA puede ser incorporado al genoma del hospedador.

Este enzima es comparable a una pequeña proteína de cadena simple, de 60-70 Kd. En algunos virus, como el retrovirus avial, es un dímero. La transcriptasa tiene tres actividades diferentes:

- (i) Puede fabricar un DNA complementario (cDNA), desde el RNA viral.
- (ii) Tiene una actividad ribonucleasa (llamada ribonucleasa H), que digiere solo la cadena de RNA de este híbrido DNA/RNA.
- (iii) Fabrica la cadena de DNA para dar la doble cadena.

En algunos virus, se ha detectado una actividad endonucleasa.

El mecanismo de la transcripción inversa de los Retrovirus es único. Este enzima, al igual que las DNA - polimerasas, necesita un iniciador. En el RSV, es una molécula de triptófano - tRNA. En otros retrovirus, esta unión, es a 10-40 nucleótidos y en otros, es un tRNA específico.

Es casi seguro, que los virus han desempeñado un papel importante en la evolución de otros organismos por el hecho de presentar la capacidad extraordinaria de transferir DNA a través de las barreras entre las especies.

La mayoría de virus recombinan frecuentemente con los cromosomas de sus hospedadores, tomando al azar piezas de estos cromosomas y transportándolas a células u organismos diferentes. Además, las copias integradas de DNA vírico han llegado a convertirse en una parte permanente del genoma de la mayoría de organismos.

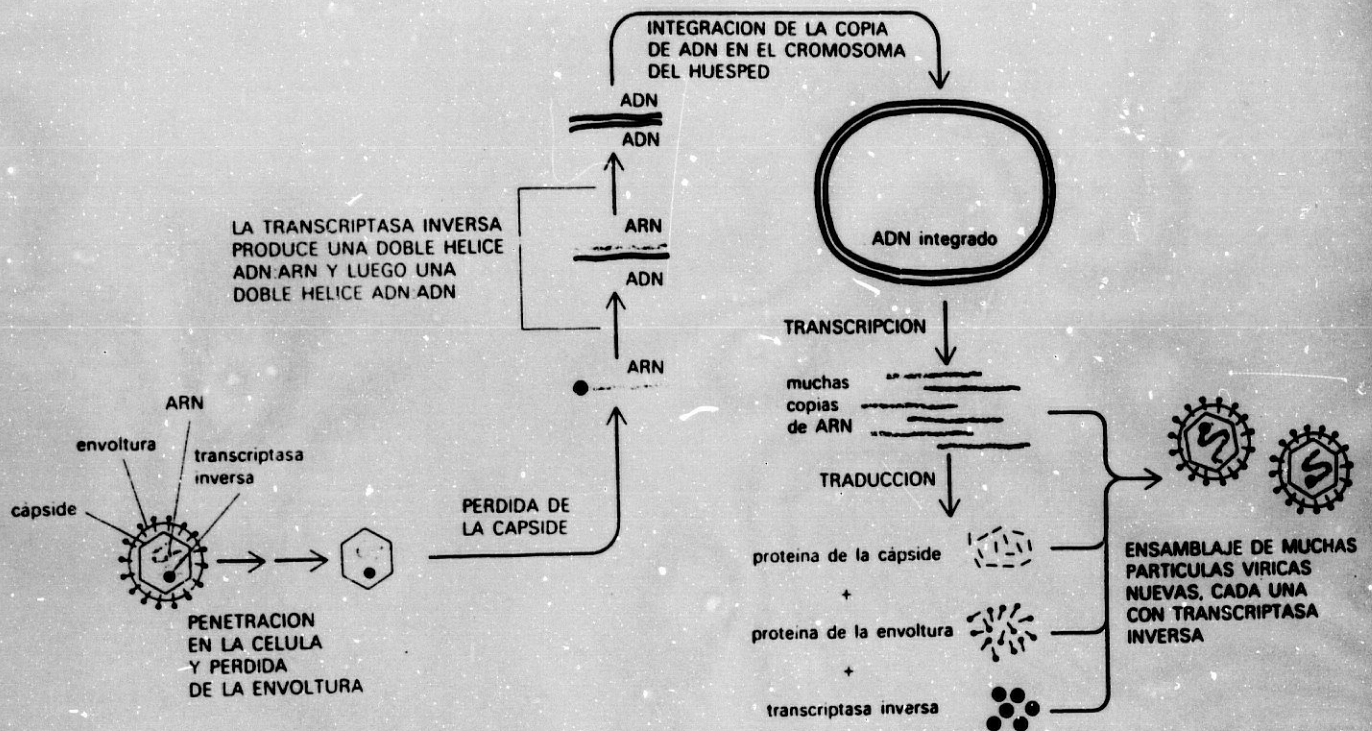


Figura 1.1: El ciclo vital de un Retrovirus. El enzima transcriptasa inversa es una DNA polimerasa que primero produce una copia de DNA a partir de la molécula de RNA vírico, y luego una segunda hebra de DNA, generando así una copia de DNA dúplex desde el genoma de RNA. La integración de este DNA dúplex en el cromosoma huésped, catalizada por enzimas desconocidos del huésped, es necesaria para la síntesis de nuevas moléculas de RNA vírico.

Aunque a menudo este DNA queda alterado de tal manera que es incapaz de producir un virus completo, aún puede codificar proteínas, algunas de las cuales son útiles para la célula. Por consiguiente, los virus hacen posible que se produzca la evolución, al mezclar las reservas génicas de diferentes organismos (Fig.- 1.1).

Hace años se descubrió que un grupo de virus convertían el RNA en DNA, invirtiendo la secuencia normal de los procesos moleculares. Según parece ahora, también pueden hacerlo otros virus y muchos organismos superiores (H. Varmus, 1987). El material hereditario de casi todos los seres vivos está formado por dos cadenas de DNA entrelazadas en una doble hélice.

Los genes que allí se encuentran controlan la actividad celular mediante dos procesos: la transcripción, en la que el DNA se copia a RNA, y la traducción, proceso en el que el RNA dirige la síntesis de proteínas. Esta secuencia de DNA - RNA - proteína resulta ser prácticamente universal.

Existen, no obstante, algunas excepciones. En ciertos virus, el material genético es RNA, y no DNA. Una subclase de virus de RNA, los Retrovirus, se apartan más de la secuencia convencional: pueden fabricar DNA a partir de RNA. Esta capacidad se denomina retrotranscripción a transcripción inversa.

Actualmente se ha detectado retrotranscripción en otros virus distintos de los Retrovirus (Summer y col., 1982), e incluso en células de levaduras, insectos y mamíferos no infectadas (Wickner, R.B., 1981; Garfinkel y col., 1985; Boeke y col. 1985; Fink y col. 1986).

La existencia de retrotranscripción fuera del ciclo de vida de un virus explicaría una serie de confusas observaciones, si bien plantearía otras interrogantes.

En los primeros estudios, no se consideró la posibilidad de que se diera actividad retrotranscriptasa fuera del ámbito de los Retrovirus.

Así, los análisis revelaron varias similitudes entre el DNA retrovívico y ciertos elementos genéticos que constituían rasgos permanentes, aunque móviles, de los cromosomas de la mayoría de los organismos, si no de todos. Se trata de los llamados elementos transponibles, o transposones, que se han detectado en bacterias, levaduras, insectos, vegetales y vertebrados.

Los estudios del elemento móvil Ty, de levaduras (Roeder y col., 1980; Scherer y col., 1982; Kostriken y col., 1983; Boeke y col., 1985; Clare y col., 1985; Mellor y col., 1985), brindaron argumentos más consistentes en favor de la retrotranscripción.

El vínculo entre provirus y elementos móviles, como el Ty de levaduras, sugirió un nuevo nombre para dichos elementos: Retrotransposones (Watson y col., 1987).

Recientemente, M. Inouye (1989) ha causado sensación al mostrar que un mecanismo de transcripción inversa existe también en algunas células sin núcleo, unas bacterias, especialmente en ciertas cepas de colibacilo aisladas en enfermos afectados de colibacilosis.

Posteriormente, se ha descubierto también en la cepa B del mismo organismo, cepa no patógena, pero no así en la cepa K12 (Lampson y col., 1989; Lim y col., 1989; Yee y col., 1984 y Dhundale y col., 1987).

Esto da al fenómeno un carácter de universalidad, ya que, generalmente, se piensa que los procariotas, de los que forman parte los colibacilos, se separaron de las células eucariotas muy pronto en el curso de la evolución, quizá inmediatamente después del inicio de la vida.

La existencia de una transcriptasa inversa en bacterias se sospecha desde hace varios años. Al estudiar ciertas bacterias del suelo, las mixobacterias, que tienen la propiedad de agragarse en colonias más o menos diferenciadas, se descubrió que además de su cromosoma, formado como el de todas las bacterias por una doble hélice de DNA, estas bacterias poseen un DNA llamado "satélite" en la estructura original (Yee y col., 1984), enlazado químicamente a un RNA de estructura ramificada (Dhundale y col., 1989).

El estudio de esta molécula en la bacteria *Myxococcus xanthus* permitió a estos autores no sólo comprender la naturaleza del enlace químico entre el DNA y el RNA, sino descubrir su mecanismo de síntesis y demostrar que se trata de un caso de transcriptasa inversa (Lampson y col., 1989; Inouye y col., 1989).

Hasta ahora, se admitía que las bacterias no poseían ningún gen que hiciera posible especificar la síntesis de este tipo de enzima. Pero se ha demostrado que esta actividad se encuentra en las mixobacterias y en el colibacilo aislado de enfermos (Inouye y col., 1989).

Analizando la región responsable de la síntesis del DNA satélite, se ha visto una región que podría traducirse en una proteína muy similar a las transcriptasas inversas de los Retrovirus.

En el genoma de levadura, existen secuencias repetitivas que son generalmente elementos genéticos móviles que portan genes internos, algunos de los cuales codifican para enzimas que los mueven de su localización cromosómica.

El elemento móvil más común en genomas de levadura, es el Ty1: está empaquetado con el elemento móvil copia de *Drosophila* y con los genomas de Retrovirus que se multiplican en células de vertebrado (Roeder y col., 1980).

Algunas de las 35 copias de elementos Ty1 completos, de 6 kbp están presentes en los genomas de la mayoría de cepas de levadura (Scherer y col., 1982; Boeke y col., 1985). Estas contienen una gran región central, que codifica para los dos productos proteicos mayoritarios, uno de los cuales es la transcriptasa inversa.

La similitud en la estructura genómica y función entre el elemento Ty1 y el genoma de los Retrovirus, sugiere no sólo que estos dos elementos tienen un origen evolutivo común, sino también que ellos se mueven hacia una localización cromosomal nueva por, esencialmente, el mismo mecanismo molecular (Kostriken y col., 1983; Clare y col., 1985).

Así, parece altamente probable que Ty1 siguiera un patrón retroviral y se transpusiera por un mecanismo de transcripción inversa de su cadena de RNA hasta producir una cadena de DNA complementario (Mellor y col., 1985). Después de la conversión de este DNA en un DNA de doble hélice, se insertaría en una nueva situación cromosómica.

La comprobación de que cada transcripción inversa ocurre de hecho, viene desde el descubrimiento de que uno de los genes Ty1 codifica para una transcriptasa inversa. Así, podemos referirnos a los elementos Ty1 como "Retrotransposones".

Por el momento el papel de la transcripción inversa, aparte de permitir la multiplicación de los Retrovirus, es desconocido. La presencia de dos transcriptasas inversas en las bacterias sugiere un origen muy antiguo de la actividad enzimática, tal como señaló Temin (1989).

## 9 INHIBIDORES DE LA TRANSCRIPTASA INVERSA.-

Actualmente se están estudiando inhibidores de la transcriptasa inversa como un paso más en la lucha frente al Síndrome de Inmunodeficiencia adquirida. Entre los agentes que se han mostrado activos frente a la replicación del HIV (Virus de Inmunodeficiencia Humana) en cultivos celulares se encuentran:

- (i) 3'-azidotimidina (Mitsuya y col., 1985)
- (ii) 2'3'dideoxinucleósidos (Mitsuya y col., 1983)
- (iii) Suramina (Mitsuya y col., 1984)
- (iv) Amonio-21-tungto-9-antimoniato (Dormont y col., 1985)
- (v) Fosfonofornato (Sarin y col., 1985)
- (vi) Antibióticos quinónicos como la estreptonigrina (Oogose y col., 1987).

Mediante los 4 últimos compuestos se puede inhibir el HIV por inhibición de la Transcriptasa inversa. En cambio, los dos primeros compuestos inhiben la transcriptasa inversa a través de sus metabolitos trifosfatados.

Algunos de estos compuestos han sido empleados en cribados de pacientes afectados de SIDA, pero los resultados no han sido concluyentes.

Para nuestro trabajo, hemos escogido como inhibidores de la transcriptasa inversa un compuesto de cada mecanismo de acción: 2'3'dideoxicitidina (ddCTP) y la Suramina sódica, Fig.- 1.2 y Fig.- 1.3.

- (i) 2'3'ddCTP: procede de los Laboratorios Boehringer-Manheim. En general, los dideoxinucleósidos han sido empleados para determinar la secuencia de nucleótidos en el DNA (Sanger y col., 1977).

Mitsuya y Breder afirman que las actividades inhibitorias de los dideoxinucleósidos frente al efecto citopatológico producido por el virus son ddCTP > ddATP > ddGTP > ddTTP.

Sin embargo, el orden de actividad inhibitoria frente a la transcriptasa inversa es ddTTP = ddGTP > ddCTP > ddATP.

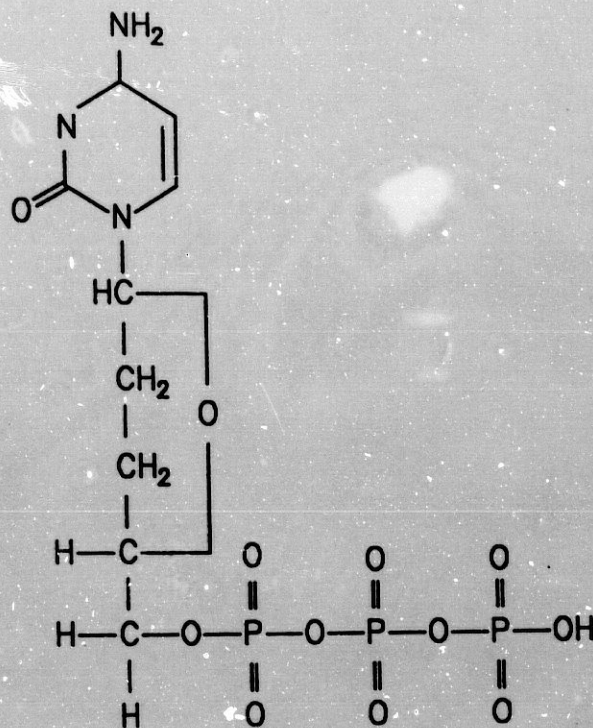


Figura 1.2: 2'3'dideoxicitidina (ddCTP)

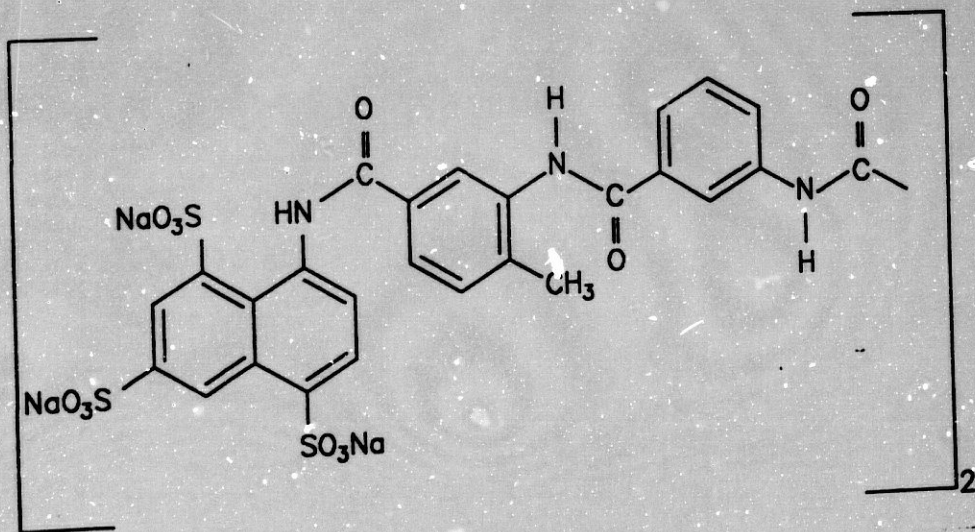


Figura 1.3: Suramina sódica



- (ii) Suramina sódica: Cedida a nuestro laboratorio por los Laboratorios Bayer. Su fórmula es (3"-urea de la sal sódica de 8- (3- benzamido- 4- metilbenzamido) naftaleno- 1,3,5- ácido sulfónico) 2 (Maregraith, 1980). Es una sustancia fácilmente soluble en agua.

Es una fármaco empleado en el tratamiento de la tripanosomiasis africana y oncocercosis (Markell y col., 1986). Es un inhibidor enzimático que parece ser selectivamente atrapado por los trypanosomas y filarias y no por las células del mamífero.

Se han hecho estudios recientes frente a células infectadas por virus tales como el HTLV-III o el productor del Adenocarcinoma colónico humano. En el primer caso, el virus HTV-III es trópico para las células T produciendo un efecto citopatológico sobre las mismas (Mitsuya y col., 1984).

Se ha visto en este caso, que la Suramina bloquea "in vitro" la infección y el efecto citopatológico de HTV-III a dosis que son clínicamente accesibles en el ser humano.

En el caso del Adenocarcinoma colónico humano, la Suramina inhibe el crecimiento de las células infectadas (Fantini y col., 1989)

---

**MATERIAL Y METODOS**

---

## 1 MATERIAL BIOLÓGICO EMPLEADO.-

### 1.1 El parásito: *Trypanosoma cruzi*.-

Los trabajos de esta tesis se han realizado sobre la cepa de *T. cruzi* denominada Maracay, aislada de un caso clínico en el Instituto de Malariología y Sanidad Ambiental de Maracay (Venezuela).

Es un flagelado de desarrollo polimórfico, que dependiendo del tipo del hospedador y su localización en el mismo, muestra distintos aspectos morfológicos con unas características, que resumidas, son:

- (i) Formas tripomastigotas sanguíneas: aparecen en sangre del hospedador vertebrado. Miden 10 a 25  $\mu\text{m}$  de largo por 1 a 5  $\mu\text{m}$  de ancho. El cuerpo presenta generalmente forma de "C" o "S", tiene un kinetoplasto grande, redondo o puntiagudo, situado a poca distancia del extremo posterior.

El núcleo ocupa un tercio del cuerpo. Desde el kinetoplasto parte un flagelo que recorre el cuerpo y queda libre un tercio de su longitud total.

- (ii) Formas amastigotas: Al penetrar las formas tripomastigotas en las células nucleadas del mamífero, sufren una reorganización dando lugar a las formas amastigotas. Estas son ovoides y miden aproximadamente 4  $\mu\text{m}$  de diámetro.

El kinetoplasto tiene forma bacilar y está situado próximo al núcleo que ocupa casi la totalidad del citoplasma. Tras un periodo de reposo de unas 36 horas, se dividen por fisión binaria cada 12 horas.

- (iii) Formas epimastigotas: Se encuentran en el intestino del vector procedentes de la diferenciación de las formas tripomastigotas sanguíneas ingeridas por el insecto. Presentan un cuerpo de 6 a 15  $\mu\text{m}$  de longitud y mayor anchura que las formas tripomastigotas.

El kinetoplasto es bacilar con situación anterior y próximo al núcleo. Poseen un flagelo largo con membrana ondulante corta. Estas formas poseen en el hospedador invertebrado una alta capacidad de división. La reproducción se lleva a cabo por fisión binaria longitudinal.

- (iv) Formas tripomastigotas metacíclicas. Aparecen en el extremo posterior del intestino del insecto hematófago por diferenciación de las formas epimastigotas. Son formas más delgadas que las tripomastigotas sanguíneas, miden unos 17  $\mu\text{m}$  de largo.

El kinetoplasto es grande, redondo y se encuentra cercano al extremo posterior. El núcleo es alargado. El flagelo permanece unido al cuerpo desde su salida próxima al kinetoplasto quedando una pequeña porción libre en el extremo anterior. Posee una gran capacidad de invasión sobre mucosas y conjuntiva. Cuando se introduce en las células del hospedador vertebrado se diferencia a amastigote.

## 1.2 Células HeLa.-

Son células aisladas de un carcinoma de cérvix de una mujer de color de 31 años por Gey y col. en 1951. Se han empleado las células HeLa como soporte celular en nuestras experiencias.

La cepa empleada procede de los Laboratorios Flow y fue donada a nuestro laboratorio por el Instituto de Investigaciones Citológicas de Valencia en el año 1976. Para el mantenimiento en el laboratorio se han empleado las siguientes técnicas:

- (i) Criopreservación. Este método parte de cultivos en monocapa cuyas células son despegadas del sustrato y se suspenden en medio MEM suplementado con un 20% v/v de suero bovino fetal, previamente inactivado a 56  $^{\circ}\text{C}$  durante 30 minutos (SBFI), y un 10% v/v de dimetilsulfoxido (DMSO, Merck). La suspensión se ajusta a una concentración final de  $10^5$  a  $10^6$  células/ml.

Esta suspensión celular se introduce en viales sometidos a enfriamiento progresivo de 1 $^{\circ}\text{C}$ /minuto hasta llegar a -170  $^{\circ}\text{C}$  en Nitrógeno líquido ( $\text{N}_2$ ).

Cuando se requieren estas células se descongelan rápidamente por inmersión de los viales en un baño maría a 37  $^{\circ}\text{C}$ . Las células se traspasan a contenedores estériles de fondo cónico (Eurotubo) en esterilidad y se centrifugan a 600 g 10 minutos previa adición de 2 volúmenes de medio MEM (20% v/v SBFI).

Esta operación se repite para eliminar el DMSO y finalmente se resuspenden las células en medio MEM con 20% de SBF1 en una concentración de  $10^5$  células/ml. Esta suspensión se vierte en frascos Roux de  $25\text{ cm}^2$  de superficie y se cultivan a  $37\text{ }^\circ\text{C}$  en atmósfera húmeda enriquecida con 5% de  $\text{CO}_2$ .

- (ii) Subcultivos de células HeLa. El medio utilizado para el cultivo de células ha sido el MEM 20% v/v SBF1 al que se le añade 100 U.I./ml de Penicilina G sódica,  $100\text{ }\mu\text{g}$  / ml de Sulfato de Estreptomicina y  $50\text{ }\mu\text{g}$  / ml de Sulfato de Kanamicina. Este medio se esteriliza por filtración a través de membranas de  $0,45\text{ }\mu\text{m}$  de tamaño de poro.

El cultivo se inicia inoculando en un frasco Roux (Costar) de  $25$  o  $75\text{ cm}^2$  de superficie una suspensión de  $10^5$  células/ml. A estos frascos se adiciona medio de cultivo renovándolo cada 4 días aproximadamente.

La alta capacidad de crecimiento de estas células hace necesaria la realización de subcultivos por tripsinización, para lo cual se retira el medio y se adiciona una solución estéril de EDTA disódico (Merck) al 0,02% en tampón PBS-Tripsina al 0,25%, pH 7,2.

Tras un primer lavado con esta solución, se añade nuevamente y se mantiene durante 1 minuto en contacto con la superficie celular. Posteriormente se retira la solución y se comprueba a los 5 minutos, por observación al microscopio invertido de contraste de fase, si las células se han despegado del frasco.

Una vez despegadas, se adiciona medio de cultivo y se disgregan muy bien por agitación hasta formar una suspensión homogénea.

Se inoculan  $10^5$  ó  $5 \times 10^5$  por cada frasco de  $25$  ó  $75\text{ cm}^2$  respectivamente. Estos se llevan finalmente al incubador de  $\text{CO}_2$  a  $37\text{ }^\circ\text{C}$ .

### 1.3 Células Vero.-

Esta línea celular se inició desde riñón de un mono verde africano adulto, por Yasumara y Kawakita, en 1962, en la Universidad de Chiba, en Japón.

Esta cepa proviene de los Laboratorios Flow y fue donada a nuestro centro por el Departamento de Microbiología de la Facultad de Medicina de la Universidad

Tabla 2.1: Medio NNN

* agar nutritivo	1,40 g
* Trypticasa	0,60 g
* ClNa	0,50 g
* Agua destilada	95,00 ml
* Sangre conejo: inactivada, 56 °C, 30m	5,00ml

de Granada en 1982. Se mantienen en el laboratorio de igual forma que se ha descrito para las células HeLa.

## 2 CULTIVO IN VITRO DE T. CRUZI.-

### 2.1 Cultivo de formas epimastigotas.-

El cultivo de estas formas se realiza en medios, en general, bifásicos que se emplean para el cultivo de la mayoría de las formas epimastigotas de otros parásitos pertenecientes al orden Kinetoplástida.

Este medio bifásico posee como fase sólida el medio de Nicolle, Novy y McNeal (NNN), (1908), y como fase líquida el medio MEM (20% v/v SBF1).

El medio NNN está constituido como se muestra en la Tabla 2.1.

Los componentes de este medio, a excepción de la sangre, se disuelven en agua bidestilada y se esterilizan al autoclave durante 20 minutos a 120 °C. Tras la esterilización, el frasco se lleva a un baño maría regulado a 45 °C.

Previamente, la sangre se inactiva durante 30 minutos a 56 °C y se mezcla con los demás componentes del medio y se distribuyen en los frascos de cultivo dejando solidificar el agar.

El medio solidificado se deja a 37 °C durante 48 horas para comprobar su esterilidad. Una vez estéril, se inocula en la superficie del medio parte de la suspensión de formas tripomastigotas sanguíneas obtenidas a partir de ratones infectados, adicionándose igual volumen de medio MEM (20% v/v SBF1).

Tras 5 días de cultivo a 28 °C, las formas tripomastigotas se diferencian a

epimastigotas, obteniéndose un cultivo en masa de estas formas de *T. cruzi*. Cada 15 días, se realiza una resiembra manteniéndose los cultivos a 28 °C.

## 2.2 Cultivo de formas metacíclicas.-

Para la obtención de estas formas utilizamos la metodología descrita por Osuna y col. (1979, 1990) y Adroher (1985). El medio de cultivo empleado es el medio Grace (Gibco) suplementado con un 10% v/v de SBFI y 100 mEq/l de ClNa.

Las formas epimastigotas obtenidas en el medio NNN con MEM (20% v/v SBFI), y en el inicio de la fase estacionaria de desarrollo, se dejan en reposo durante 2 horas a 28 °C al objeto de obtener en el sobrenadante las formas más activas.

El sobrenadante se centrifuga a 1000 g y el botón de parásitos se resuspende en el medio ajustando el número de flagelados a  $10^6$  /ml. Seguidamente se inoculan en frascos Roux de 75 cm<sup>2</sup> de superficie con un volumen de medio de 10 ml.

Los cultivos se mantienen a 28 °C y aproximadamente a los 9 días el porcentaje de formas metacíclicas oscila entre un 60% y un 90%.

La diferenciación se comprueba por visualización de los parásitos al microscopio de contraste de fase, recuento en cámara hemocitométrica de Neubauer y tinción con solución acuosa de Giemsa al 10% v/v previa fijación de los parásitos con metanol durante 30 segundos.

## 3 CULTIVO DE T. CRUZI EN CELULAS HeLa.-

La metodología empleada ha sido puesta a punto en nuestro laboratorio a través de los estudios realizados sobre la interacción parásito-célula (Osuna y col., 1984 b).

Las células HeLa se cultivan en frascos Roux (Costar) de 25 ó 75 cm<sup>2</sup> de superficie, o bien en placas de microtitulación (Nunc) con pocillos de fondo plano. En este último caso, tras cortar a medida del receptáculo unos cubre-objetos de vidrio borosilicado, se lavan con una mezcla de etanol:éter (1:1) y se esterilizan al autoclave a 120 °C durante 20 minutos.

Los cubre - objetos son colocados en los pocillos de la placa de microtitulación con ayuda de unas pinzas estériles. Seguidamente con ayuda de una micropipeta (Flow), se inocula en cada receptáculo una cantidad igual y conocida de una suspensión de células en medio MEM (20% v/v SBF1) y se llevan las placas al incubador de  $CO_2$  regulado a 37 °C.

Para la infección de las células, los cultivos se sincronizan previamente durante 12 horas con medio MEM (20% v/v SBF1) más 25 mM de Timidina (Sigma).

Los cultivos sincronizados en la fase S del ciclo celular, se lavan con solución de Hanks y se inoculan las formas metacíclicas purificadas suspendidas en medio M-3 de Meyer (1970).

La relación parásito - célula oscila entre 1/1 y 10/1, dependiendo de la experiencia de que se trate. Los cultivos se mantienen a 37 °C y 5% de  $CO_2$  durante el periodo de interacción que puede oscilar de 1 a 12 horas, dependiendo de las experiencias.

Transcurrido este tiempo, se retira el medio y se lavan tres veces con solución de Hanks al objeto de retirar los parásitos que no hayan penetrado, comprobándose al microscopio de contraste de fase la ausencia total de parásitos extracelulares.

Después del último lavado se adiciona medio de cultivo. Para interrumpir los cultivos, se retira el medio y con ayuda de unas pinzas se recogen los cubre - objetos, en los que están adheridas las células, se lavan con solución de Hanks, se fijan con metanol 30 segundos y finalmente se tiñen durante 15 minutos con solución acuosa de Giemsa al 10% v/v.

## 4 OBTENCION DE FORMAS EPIMASTIGOTAS, METACICLICAS Y AMASTIGOTAS DE T. CRUZI.-

### 4.1 Cultivo de formas epimastigotas.-

#### Medio bifásico.-

Este procedimiento ha sido comentado ya capítulos anteriores.



Tabla 2.2: Medio LIT

* NaCl	4 g
* KCl	0,4 g
* $PC_4HN_{a_2}$	8 g
* Glucosa	2 g
* Suero bovino fetal inactivado	100 ml
* Solución de hemoglobina al 10%	20 ml
* Agua bidestilada	750 ml
* Solución 5% infusión hígado buey	100 ml/l
* Triptosa	5g/l

**Medio monofásico.-**

Se emplea el medio LIT adicionado con un 10% de SBF1. Este medio se esteriliza mediante filtración por membrana de 0,45  $\mu$ m de poro, y se distribuye en frascos Roux con 10 ml en cada uno.

Después de unos 7 días de cultivo, se obtiene el máximo número de epimastigotes. La composición del medio LIT se recoge en la Tabla 2.2 y se ajusta el pH a 7,3 con ClH o KOH 0,1 M.

**4.2 Cultivo de formas metacíclicas.-**

Una vez que hemos obtenido la diferenciación de formas epimastigotes a metacíclicas según se ha descrito en el capítulo anterior, la purificación se realiza siguiendo la metodología puesta a punto por Castanys y col. (1984).

La purificación de las formas metacíclicas se realizó en gradiente discontinuo de Percoll (Pharmacia Fine Chemical). Estos gradientes se separaron usando una solución stock de Percoll isotonzado con ClNa 1,5 M y ajustando el pH a 7,4 con ClH 0,1 N.

Para la isotonzación se mezclan 9 partes de Percoll y 1 de ClNa 1,5 M dando como resultado una densidad de 1,122 g/ml. Se prepararon tres gradientes de 3 ml cada uno: 1,070, 1,065 y 1,060 g/ml, por dilución de la solución stock con ClNa 0,15 M.

Los flagelados se centrifugan a 1000 g durante 10 minutos, se resuspenden en

3 ml de la solución stock de Percoll y se colocan en tubos de vidrio de 15 ml de capacidad.

Después de adicionar los gradientes, los tubos se centrifugan a 250 g durante 1 hora a 4 °C en una centrífuga Beckman (J2-21M) con rotor basculante JS-13, siendo el tiempo de aceleración de 4 minutos y de deceleración de 6 minutos.

Se recoge la interfase 1,065/1,070 donde se encuentran la mayoría de los metacíclicos con un porcentaje de pureza próximo al 100%. El Percoll se elimina por centrifugación a 200 g en 10 volúmenes de solución de Hanks. Los metacíclicos obtenidos son los que se utilizan en las experiencias realizadas para este trabajo.

#### 4.3 Obtención de formas amastigotas a partir de cultivos celulares.

Como soporte celular para la obtención de formas amastigotas intracelulares de *T. cruzi*, hemos empleado células Vero.

Las formas amastigotas intracelulares de *T. cruzi* se obtienen a partir de células Vero, mantenidas en frascos Roux (Costar) de 25 cm<sup>2</sup> de superficie en medio MEM (20% v/v SBF1), e infectadas con formas metacíclicas obtenidas de acuerdo con la metodología descrita en la sección anterior.

Transcurrido el periodo de interacción, los cultivos se lavaron exhaustivamente con solución de Hanks para eliminar los parásitos extracelulares.

Los cultivos se mantienen durante 7 días a 37 °C y 5% de CO<sub>2</sub>, con un cambio de medio en el tercer día. A partir del séptimo día pueden observarse abundantes formas amastigotas salidas de las células.

Para la purificación de las formas amastigotas, se siguió la metodología descrita por Gamarro y col. (1985), utilizando un gradiente discontinuo de densidad de Percoll.

La solución stock de Percoll se prepara mezclando 9 volúmenes de Percoll con 1 volumen de ClNa 1,5 M. Se preparan 5 gradientes de 2 ml cada uno por adición de ClNa 0,15 M a la solución stock de Percoll: 1,10, 1,09, 1,08, 1,07 y 1,06 g/ml.

Las formas amastigotas suspendidas en la solución stock de Percoll se colocan en el fondo de un tubo de 15 ml de capacidad. Después de adicionar los gradientes, los tubos se centrifugan a 250 g durante 30 minutos a 4 °C en una centrífuga

Beckman (J2-21M) con rotor basculante JS-13.

La mayoría de las formas amastigotas se obtienen en la interfase 1,07 / 1,08. Para eliminar el Percoll, se adicionan 10 volúmenes de solución Hanks y se centrifuga a 200 g durante 10 minutos.

## 5 OBTENCION DE NUCLEOS DE CELULAS HeLa NO PARASITADAS Y PARASITADAS POR T. CRUZI.-

Cultivos de células HeLa en frascos Roux de 75 cm<sup>2</sup> de superficie (5x10<sup>6</sup> células / frasco), fueron infectados durante 6 horas a 37 °C con formas metacíclicas de *T. cruzi*, en una relación parásito : célula de 10:1 en medio MEM sin SBFI.

Transcurrido el periodo de interacción, se procedió al lavado de los cultivos con adición de PBS para retirar los parásitos que no habían penetrado en las células, adicionándoles posteriormente, medio MEM con SBFI durante 15 horas.

Posteriormente los cultivos infectados y otros no infectados que iban a actuar como control, se procesaron para la obtención de núcleos procedentes de células HeLa parasitadas y no parasitadas como se detalla a continuación:

- (i) Se procedió a un lavado de los cultivos con tampón PBS para eliminar los restos de medio. Una vez lavados, estos cultivos fueron tratados con tripsina (1:250) al 0,25% en tampón PBS durante 5 minutos a 37 °C para despegar las células del sustato.
- (ii) Estas células despegadas fueron centrifugadas a 1000 r.p.m. durante 10 minutos, y al botón obtenido se le agregaron 4 ml de Nonidet-NP 40 al 0,1% en solución 0,25 M de sacarosa conteniendo 3 mM de Cl<sub>2</sub>Ca y 1,5 mg/ml de Heparina (Krawczyk, 1987).

Se agitó durante 4 minutos en frío para obtener los núcleos celulares y las formas amastigotas intracelulares del parásito libres.

- (iii) Una vez conseguido esto, se procedió a un lavado en solución de sacarosa 0,25 M y Cl<sub>2</sub>Ca a 4 °C por centrifugación a 1000 g durante 7 minutos. Este

lavado se repitió 2 veces.

El botón obtenido, se resuspendió en la solución anterior y se depositó en la parte superior de un gradiente discontinuo de densidad de sacarosa 0,5, 0,675 y 1,5 M conteniendo  $Cl_2Ca$  3 mM y Heparina 1,5 mg/ml. Se procede a una centrifugación a 1000 g durante 30 minutos a 4 °C.

De este modo, los núcleos se obtienen en el botón del tubo, mientras que los parásitos y las membranas celulares se encuentran en las fases superiores.

Finalmente, los núcleos se lavaron con solución de sacarosa 0,25 M y de este modo se dejaron listos para su procesamiento.

Las pipetas y tubos de centrifuga empleados en este proceso son todos previamente pasados por diclorodimetilxilano y se dejan secar antes de su utilización.

La ausencia de formas amastigotas en la fase donde recogemos los núcleos se comprueba mediante fijación con metanol de una muestra en ur. porta, posterior tinción de la muestra con Giemsa al 10% y observación al microscopio óptico, así como con la posterior inoculación de una alícuota de los núcleos en medio de cultivo y en un cultivo de macrófagos, donde no se observa crecimiento de los kinetoplástidos.

## 6 DETERMINACION DE LA CANTIDAD DE PROTEINAS.-

Una vez obtenidos los núcleos de células HeLa no parasitadas y parasitadas por *T. cruzi*, se procedió a la sonicación de las muestras (Sonicador Virtis, Virsonic 50), y a la determinación de la cantidad de proteínas siguiendo el método descrito por Bradford (1976), (BioRad). La técnica fue la siguiente:

- (i) Se prepara una solución de albúmina (Sigma) a la concentración de 1mg/ml.
- (ii) Se adiciona 0,8 ml de solución de PBS a cubetas con 1 ml de capacidad.

7 OBTENCION DE ANTICUERPOS FRENTE A NUCLEOS DE CELULAS  
38 HeLa PARASITADAS POR T. CRUZI.-

- (iii) A las cubetas patrón se añaden 2, 4, 8 y 16  $\mu\text{l}$  de la solución de albúmina.
- (iv) A las cubetas problema se añaden 5 a 10  $\mu\text{l}$  de la solución de proteínas problema. Previa a la adición de los patrones y los problemas se retira el mismo volumen de tampón de las cubetas.
- (v) A todas las cubetas se adicionan 200  $\mu\text{l}$  de la solución del Kit y se agitan para homogeneizar el contenido de cada cubeta.
- (vi) Se incuba a temperatura ambiente de 15 a 60 minutos.
- (vii) Se efectua la lectura a 595 nm en un espectrofotómetro Zeiss (PM2K), previo ajuste del 0 con un blanco formado por el mismo volumen de tampón y de solución del Kit empleado en nuestras muestras.

Con los valores de densidad óptica de los patrones se construye una recta de regresión por el método de los mínimos cuadrados y su correspondiente coeficiente de correlación lineal, representando densidades ópticas a 595 nm frente a la cantidad de proteínas.

Según la ecuación de la recta y con ayuda de un ordenador estimamos la cantidad de proteínas de la muestra problema.

7 OBTENCION DE ANTICUERPOS FRENTE A  
NUCLEOS DE CELULAS HeLa PARASITADAS  
POR T. CRUZI.-

Obtenidos los núcleos de células HeLa parasitadas por *T. cruzi*, tal como se ha descrito en el capítulo anterior, dichos núcleos se sonicaron en un sonicador (Virtis, Virsonic 50), durante 30 pulsaciones por minuto, con una intensidad del 99%.

Comprobado microscópicamente que los núcleos se habían disgregado, el frasco conteniendo los mismos, se guardó a 0 °C hasta la realización de los liposomas.

Tabla 2.3: Fase lipídica

* Fosfatidilcolina de huevo (IX-E Sigma)	2 mg
* Desoxicolato sódico (Sigma)	1 mg
* Cloroformo	5 ml

Tabla 2.4: Fase acuosa

* Proteínas	80, 40, 20 y 10 $\mu\text{g}$
* PBS	500 $\mu\text{l}$

### 7.1 Preparación de Liposomas.-

Para la preparación de los liposomas, se siguió el método descrito por Medina y col. en 1986.

(i) Fase lipídica: Tabla 2.3.

(ii) Fase acuosa: Tabla 2.4.

Se solubilizaron los componentes lipídicos en el disolvente orgánico volátil. Este disolvente se evaporó en un rotavapor Buchi modelo R-100, y a 37 °C (temperatura superior a la de transición del fosfolípido empleado). Como resultado aparece adherida a las paredes del matraz una película lipídica.

Se adicionó al matraz la fase acuosa por agitación constante durante 30 minutos a una temperatura superior a la de transición del fosfolípido empleado (temperatura de transición para la fosfatidilcolina de 25-30 °C) para dispersar los componentes lipídicos en el agua.

Dado que la relación molar lípido/agua es baja, los fosfolípidos tienden a adoptar de forma espontánea su conformación termodinámica más estable, es decir, adoptan una estructura de bicapas lipídicas concéntricas englobando en sus compartimentos acuosos la proteína, en función del carácter hidrosoluble de la misma.

El resultado fue una suspensión de aspecto lechoso de liposomas transportadores de proteínas, en el exceso de la fase acuosa. La suspensión se mantuvo en

reposo durante 1 hora, con el fin de favorecer el crecimiento y formación de los liposomas.

Esta técnica es específica para la obtención de liposomas multilaminares o pluricompartimentales. El tamaño de los mismos oscila entre 0,5-10  $\mu\text{m}$ .

### 7.2 Inmunización de los ratones.-

Los ratones BALB/C fueron inoculados por vía intraperitoneal mediante la suspensión de los liposomas con la cantidad de proteína citada anteriormente, durante 4 semanas, espaciándose las dosis cada 7 días.

Transcurridos 7 días de la última inyección, los animales fueron sacrificados desangrándose mediante la rotura de la carótida, dejando coagular la sangre y obteniendo así el suero.

### 7.3 Inmunización mediante Coadyuvante de Freund -

El Coadyuvante de Freund constituye un conjunto de lípidos y paredes bacterianas procedentes del *Mycobacterium* (Roitt y col. 1989). Dicho coadyuvante permite conseguir una respuesta inmunológica elevada, superior a la inyección de antígenos libres no atrapados en liposomas.

Dada la respuesta inmunológica que el coadyuvante de Freund puede producir en los animales inoculados con el mismo, procedimos a realizar 2 lotes:

- (i) Un lote inoculado únicamente con 0,1 ml de coadyuvante de Freund + 0,1 ml de PBS, mediante la misma pauta de administración descrita anteriormente
- (ii) Otro lote de ratones al que se le inoculó una suspensión formada por 0,1 ml de coadyuvante de Freund + 0,1 ml de la suspensión de los núcleos sonicados.

Tras realizar la última inyección y obtener a los 7 días el suero de los animales, éstos, al igual que los procedentes de la inmunización por liposomas, fueron mantenidos en alícuotas separadas de 0,2 ml a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

## 8 TITULACION DEL SUERO ANTI - NUCLEOS DE CELULAS HeLa PARASITADAS POR *T. CRUZI*.-

Los sueros obtenidos mediante los distintos métodos de inmunización, fueron adsorbidos sobre una capa de células HeLa previamente fijadas con acetona al objeto de eliminar aquellos anticuerpos obtenidos de la inmunización específicos de células HeLa no parasitadas, y así, retener exclusivamente los que fuesen de origen parasitario.

La adsorción se hizo incubando el suero con la monocapa celular durante 12 horas a temperatura de laboratorio. Al objeto de evitar las posibles contaminaciones bacterianas, se le adicionó al suero azida sódica al 0,1%.

Transcurrido este tiempo fue recogido y quedó listo para su titulación mediante Inmunofluorescencia Indirecta (IFI).

Cultivos de células HeLa en placas de microtitulación, de fondo plano, conteniendo cubres borosilicados redondos y estériles, se infectaron durante dos horas con formas metacíclicas de *T. cruzi*.

Transcurrido este tiempo, se lavaron para retirar los parásitos que no hubiesen penetrado y se fijaron con acetona durante 30 minutos a -20 °C. Posteriormente, unos cubreobjetos se tiñeron con Giemsa al 10%, al objeto de poder evaluar microscópicamente el porcentaje de parasitación y el índice parásito / célula.

El resto de los cubreobjetos con los cultivos celulares, se permeabilizó con Triton X-100 al 0,1% v/v en PBS, durante 10 minutos.

Transcurrido este tiempo, y tras varios lavados con PBS para arrastrar el exceso de detergente, las células se incubaron durante 1 hora a 37 °C con distintas diluciones de los sueros. Las diluciones fueron: 1/25, 1/50, 1/100, 1/200 y 1/400.

Tras la incubación, las células fueron sometidas a 5 lavados de 10 minutos cada uno, con PBS conteniendo Tween 20 al 0,05% v/v, incubándose posteriormente durante 30 minutos a 37 °C con un anticuerpo antisuero de ratón obtenido en conejo, marcado con fluoresceína, diluido al 1/200 como especifica la casa comercial en PBS conteniendo 1/10.000 de Azul de Evans (Sigma).

Transcurridos los 30 minutos de incubación en cámara húmeda, se realizaron 5 lavados, de 10 minutos cada uno, con PBS-Tween 20 a la concentración de 0,05%



v/v, y un último lavado con PBS, montándose las preparaciones en glicerina tamponada al 10% para su observación al microscopio de fluorescencia (Olympus BH 2 RFCA).

Los sueros se titularon frente a:

- (i) Células parasitadas durante 2 horas y sacrificadas transcurrido este tiempo mediante fijación con acetona(Merck).
- (ii) Células infectadas durante 2 horas y sacrificadas a las 12 horas de la infección mediante fijación con acetona.
- (iii) Células infectadas durante 2 horas y sacrificadas a las 24 horas de la infección mediante fijación con acetona.
- (iv) Control de células no parasitadas.

Este suero también se tituló frente a:

- (i) Formas epimastigotas de *T. cruzi*.
- (ii) Formas metacíclicas de *T. cruzi*.
- (iii) Formas amastigotas de *T. cruzi*.

Estas formas fueron obtenidas como se detalló en el capítulos anteriores. Con estas formas del parásito se hicieron extensiones sobre portaobjetos y se fijaron con acetona para continuar con la técnica de IFI.

## 9 CROMATOGRAFIA DE AFINIDAD.-

### 9.1 Obtención de las IgG de suero de ratones inmunizados frente a núcleos de células HeLa parasitadas por *T. cruzi* mediante una columna de Proteína A - Sepharosa.-

Al objeto de purificar las inmunoglobulinas G obtenidas de los inmuniseros de ratón tras la inoculación de los mismos con núcleos de células HeLa parasita-

das por *T. cruzi*, se procedió a realizar una cromatografía de afinidad mediante Sepharosa ligada a Proteína A.

La proteína A tiene la propiedad de ligar inmunoglobulinas G de muchas especies de mamíferos (Kronvall y col., 1970; Langone, 1978; Goudswaard, 1978).

Al objeto de ligar dicha proteína A procedente de cultivos de *Staphilococcus aureus*, a la sepharosa activada con bromuro de cianógeno, se siguió el procedimiento descrito por el manual de Pharmacia.

Para ello, se pesa 1 gramo de Sepharosa CL 4B activada con bromuro de cianógeno, teniendo en cuenta que 1g de peso seco produce aproximadamente 3,5 ml de gel.

Dicha sepharosa fue hidratada durante 15 minutos en una solución de ClH 1 mM. Tras este proceso de hinchado, la sepharosa se filtró a través de un filtro de vidrio, lavándose con ClH 1 mM. Se utilizaron aproximadamente 200 ml de solución de ClH por gramo de gel.

Preparada la sepharosa, se le adicionó la proteína A previamente disuelta en tampón de acoplamiento ( $\text{NaHCO}_3$  0,1 M a pH 8,3, conteniendo 0,5 M de ClNa). La mezcla de sepharosa - proteína A se mantuvo en agitación durante toda la noche a 4 °C. La cantidad de proteína A/ml de gel fue de 10 mg.

Tras filtrar nuevamente a través de filtro de vidrio, se transfirió a tampón de bloqueo (Glicina 0,2 M a pH 8), manteniéndose en el mismo durante 2 horas en agitación a temperatura de laboratorio.

Se lavó el exceso de tampón de bloqueo con tampón de acoplamiento, se filtró nuevamente y se transfirió a tampón acetato (Acetato sódico 0,1 M a pH 4, conteniendo 0,5 M de ClNa). Posteriormente se volvió a lavar con tampón de acoplamiento al que se le había adicionado 0,1 M de azida sódica.

Una vez acoplada la proteína A a la sepharosa, se procedió al montaje de la columna. Dicha columna fue empleada para separar las Inmunoglobulinas G tanto de los ratones normales, como de los ratones inmunizados con núcleos más coadyuvante de Freund, núcleos más liposomas y ratones control, solo con coadyuvante de Freund.

Los sueros se diluyeron en tampón glicina a pH 8,9, conteniendo 0,5 M de ClNa. El flujo de la columna fue en todos los casos de 35-40 ml/hora.

La columna fue conectada a un monitor UV 1 (Pharmacia), compuesto de una unidad óptica con una célula de flujo de 3 mm y longitud de onda de operación de 280 nm y una unidad de control ajustada a una sensibilidad de 0,1 unidades de Absorbancia (UA), todo ello conectado a una unidad de control del monitor UV 1, y un registrador gráfico acoplado a la unidad de control (Linseis, modelo L 600).

Las soluciones tampón empleadas en todos los casos fueron (Sjöquist y col., 1972):

- (i) Tampón Glicina pH 8.9 conteniendo ClNa 0.5M.
- (ii) Tampón Citrato pH 4.0 conteniendo ClNa 0.5M.
- (iii) Tampón Citrato pH 3.0 para la regeneración de la columna de afinidad.

Al eluir el suero total, por la absorbancia del mismo se obtiene un pico correspondiente a las proteínas del suero no ligadas a la proteína A.

Tras obtener un registro en el que la absorbancia baja hasta la línea basal inicial, la columna fue eluida con tampón citrato pH 4 conteniendo 0,5 M de ClNa.

Con el cambio de pH las inmunoglobulinas G acopladas a la proteína A, se desligan de la misma, obteniéndose y recogiendo las mismas para análisis posteriores. La columna fue regenerada con tampón citrato pH 3, almacenándose en etanol al 20% a 4 °C.

## 9.2 Formación de una columna de Sepharosa CL4B - IgG.

Se procedió con las inmunoglobulinas G purificadas (Ig G), procedentes de cada uno de los lotes de ratones, a la preparación de las diferentes columnas de sepharosa - Ig G.

Para ello, las Ig G procedentes de sueros de ratones normales (Ig Gn) y las procedentes de sueros de ratones inmunizados con núcleos de células HeLa parasitadas por *T. cruzi* (Ig Gp), se dializaron y liofilizaron, determinándose la cantidad de proteína mediante el método de Bradford (1976).

El método seguido para la unión de la sepharosa fue el mismo que se describe en el apartado anterior para la unión de sepharosa y proteína A.

## 10 OBTENCION DE ANTIGENOS DE NUCLEOS DE CELULAS HeLa PARASITADAS POR *T. CRUZI*.

Se parasitaron cultivos en monocapa de células HeLa con formas metacíclicas de *T. cruzi* en una relación 1:10, durante un periodo de tiempo de 6 horas en medio MEM sin SBF1.

Transcurrido este tiempo, estos cultivos se lavaron para quitar todos los parásitos que no habían penetrado en las células, y se dejaron en medio MEM con un 10% SBF1 durante 15-18 horas. Pasado este tiempo, se obtuvieron los núcleos de esas células según la metodología ya descrita.

Estos núcleos se sonicaron y se disolvieron en solución de PBS con Triton X-100 al 0,1%, centrifugándose y cromatografiándose por la columna de Sepharosa - Ig Gn, para purificar los antígenos que nos interesaban.

Tras recoger las proteínas no ligadas a las Ig Gn, se procedió a una elución de las proteínas ligadas a las Ig Gn, empleando como eluyente 0,1 M de tampón Glicina - ClH, pH=3.

La fracción que nos interesaba era la primera fracción, con la cual continuamos trabajando. Esta fracción se cromatografió posteriormente por la columna de Sepharosa -Ig Gp, obteniendo dos fracciones. En esta segunda fracción se encuentran los antígenos de núcleos de células HeLa parasitadas por *T. cruzi*.

En todos los casos, el flujo de las distintas columnas fue de 30-40 ml/hora.

Los tampones empleados en esta cromatografía de afinidad fueron:

- (i) Tampón Fosfato a pH 7,2, que se empleó para la obtención de la fracción de proteínas no retenida por la columna.
- (ii) Tampón Glicina - ClH a pH 3,0. Se empleó para la elución de los proteínas retenidas en la columna.

A través de las columnas, no sólo se pasaron los núcleos de las células HeLa parasitadas por *T. cruzi*, sino que también se pasaron extractos de núcleos de células HeLa sin parasitar, extractos de formas metacíclicas purificadas, formas epimastigotas y formas amastigotas de *T. cruzi*.

En todos los casos el flujo fue de 30 ml/hora. Las fracciones obtenidas se desalinizaron por dialización frente a agua bidestilada, y se liofilizaron para su posterior ensayo.

## 11 ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA.-

Los geles de poliacrilamida al 12,5% se preparan de acuerdo con el método de Laemmli y Favre (1973), de tampón discontinuo de dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE).

### 11.1 Aparato de electroforesis.

La celda de electroforesis empleada en nuestras experiencias es de lámina plana vertical.

El montaje para la colocación del gel comprende dos placas de vidrio en forma rectangular con un margen de separación entre las placas de 1,5 mm, determinado por dos tiras de teflón situadas a los laterales de las placas.

Estas se sellan por los laterales menos por la parte superior con parafim. Para mejorar la adherencia se colocan unos clips de doble canto en los laterales.

### 11.2 Preparación de los geles.

Se utilizan dos tipos de geles, uno de poro pequeño o gel separador, en el que se realiza la separación de los polipéptidos, y otro de poro grande o almacenador, situado en la parte superior de la placa, que tiene como finalidad ir disponiendo los polipéptidos para su entrada en el gel separador.

\* Solución stock de acrilamida - bisacrilamida al 30%: Tabla 2.5.

\* Gel almacenador al 4%: Tabla 2.6.

El gel separador se prepara normalmente al 12,5 % y está formado como se señala en la Tabla 2.7.

Tabla 2.5: Solución stock acrilamida / bisacrilamida 30%

29,2 g de acrilamida (Merck)	29.2 g
0,8 g de bisacrilamida (Merck)	0.8 g
Agua bidestilada c.s.p.	100 ml

Tabla 2.6: Gel almacenador 4% (+N,N,N',N'-tetrametiletildiamina, Merck)

Solución stock acrilamida - bisacrilamida	0,55 ml
Tampón del gel almacenador (SDS 0,4% y 0,5 M Tris-ClH, pH=6,8)	1,00 ml
TEMED+	4,00 $\mu$ l
Persulfato amónico (Merck) 10%	12,00 $\mu$ l
Agua bidestilada	2,415 ml

Tabla 2.7: Gel separador

* Solución stock de acrilamida - bisacrilamida	14,315 ml
* Tampón de gel separador SDS al 0,4% y Tris-ClH 1,5 M, pH=8,8	8,75 ml
* TEMED	35,00 $\mu$ l
* Persulfato amónico al 10%	0,1 ml

Tabla 2.8: Tampón de corrido

* Tris	3 g
* Glicocola	14,4 g
* SDS	1 g
* Agua bidestilada c.s.p	1000 ml

Tabla 2.9: Tampón de muestra

* Tris-CIH	62 mM
* SDS	2%
* 2-mercaptoetanol (Merck)	5%
* Glicerol	17% v/v
* Azul de bromofenol	0,024%

Tanto el persulfato amónico como el TEMED se añaden después de desgasear los geles.

El gel separador se vierte entre las dos láminas de vidrio y a continuación se adiciona una pequeña cantidad de agua para conseguir la superficie del gel lo más recta y homogénea posible, e impedir el contacto del oxígeno del aire con el gel.

Después de la polimerización del gel, se retira el agua y se vierte el gel almacenador previa introducción del peine para formar los pocillos de la muestra. Estos pocillos son de 0,5 cm de ancho aproximadamente. Cuando ha polimerizado el segundo gel, se retira el peine.

Se retira el sello de parafilm y se montan los cristales en la cubeta. Se añade el tampón de corrido en los depósitos inferior y superior.

La composición del tampón de corrido se recoge en la Tabla 2.8. El pH se ajusta con CIH 1N a 8,3.

### 11.3 Preparación de las muestras.-

Las muestras se disuelven en el tampón de muestra formado por: Tabla 2.9.

Las muestras se agitan en un sonicador y se calientan durante 5 minutos a ebullición. A los pocillos del gel se añaden de 5 a 10  $\mu$ l de la muestra conteniendo un máximo de 20  $\mu$ g de proteínas y se conecta a un voltaje de 60 V durante

Tabla 2.10: Solución fresca de plata amoniacal

* $NH_4OH$	1,4 ml
* NaOH al 0,36%	21 ml
* $NO_3$ Ag al 20%	4 ml
* Agua bidestilada c.s.p	100 ml

30 minutos, fijándolo en 120-130 V durante 6-9 horas, o bien se mantiene el amperaje constante de 10 mA durante 30 minutos y luego se fija a 20 mA durante aproximadamente 4 horas.

Una vez realizada la electroforesis, el gel se fija durante toda la noche en una solución de metanol : acético : agua (5:1:4).

## 12 TINCION DE PLATA PARA LA DETECCION DE POLIPEPTIDOS EN GEL DE POLIACRILAMIDA.-

Empleamos la metodología descrita por Oakley y col. (1980).

Tras la fijación de los geles se procede de la siguiente manera:

- (i) El gel se sumerge en una solución de glutaraldehído (Merck) al 5% v/v en agua bidestilada, manteniéndose durante 30 minutos.
- (ii) Se somete a 5 lavados de 10 minutos cada uno con 300-400 ml de agua bidestilada.
- (iii) Tras eliminar el agua, se adiciona una solución fresca de plata amoniacal constituida por: Tabla 2.10.

La solución de nitrato de plata se adiciona lentamente en agitación continua a la formada por el hidróxido sódico y el amónico, con el fin de evitar la formación de precipitado marrón irreversible. Una vez disuelto el nitrato de plata, se completa con agua bidestilada.



Tabla 2.11: Solución recién preparada del revelador

* Acido cítrico	5 mg
* Formaldehido al 36%	25 $\mu$ l
* Agua bidestilada	100 ml

El gel se sumerge y se agita constantemente durante 10 minutos.

- (iv) Se elimina la solución de nitrato de plata amoniacal y se lava el gel con 300-400 ml de agua bidestilada durante 2 veces durante 10 minutos.
- (v) Se transfiere el gel a una solución recién preparada del revelador: Tabla 2.11.

Las bandas de desarrollo se visualizan lenta y gradualmente. Para parar la tinción, se lava 3 veces con agua bidestilada y se sumerge 1 minuto en fijador ácido de Kodak.

Para conservar los geles se pueden someter a secado. Para ello, el gel se incuba toda la noche en solución de metanol:glicerina:agua (30:3:67), se deposita sobre un papel Whatman 3MM y se cubre con una película de poliéster.

Se introduce en un secador de geles regulado a 90°C y se aplica vacío durante un período de 2-3 horas.

También se empleó otro método de tinción de nitrato de plata mediante el cual se tiñen los polipéptidos de distinto color dependiendo de su composición (Adams y Sammons, 1981).

- (i) Fijación: etanol:acético:agua (50:10:40): 2 horas
- (ii) Lavados con agua bidestilada (3x): 1 hora
- (iii) Equilibración del gel con nitrato de plata (0,19%): 1 hora
- (iv) Lavado con agua destilada: 10-20 segundos

- (v) Tratamiento con solución reductora de formol (36%) 0,75 ml en 100 ml de NaOH 0,75 N: 10 minutos
- (vi) Intensificador de color, carbonato sódico al 0,75%,: dos tratamientos de 2 horas
- (vii) La reacción se para con agua destilada o ácido acético al 5% v/v.

### 13 MEDICION DE LA TRANSCRIPTASA INVERSA.-

Al objeto de estudiar el posible papel enzimático del antígeno de *T. cruzi* retenido en la columna específica, tras la inmunización y adsorción de los sueros, se procedió a estudiar si dicha fracción poseía un papel de Retrotranscriptasa, para lo que se procedió a seguir la metodología de Chandra (1972) y Schleif (1981), optando por este segundo método modificándolo para ponerlo a punto de acuerdo con nuestro material.

La metodología de Chandra (1972), consiste en la preparación de una mezcla de incubación formada por: tabla 2.12.

Tabla 2.12: Mezcla de incubación según el método de Chandra

* Timidina tritiada 5' trifosfato tetrasódica (metil- <sup>3</sup> H) 100 $\mu$ C/2 ml	40 $\mu$ l
* dATP (5 mg/ml)	0,01 ml
* dCTP (5 mg/ml)	0,01 ml
* dGTP (5 mg/ml)	0,01 ml
* poli A(dT)12-18 (1 mg/5 ml)	0,01 ml
* Cloruro magnésico (0,025 M)	0,02 ml
* Nonidet NP 40 (5%)..	0,01 ml
* Tampón de incorporación	(0,02 ml):
	** Tris-ClH 1 M, pH 7,8
	** ClK 2 M
	** Ditiotreitól 0,02 M
* Agua bidestilada estéril	0,10 ml
* Preparación enzimática (muestra problema)	0,02 ml.

La mezcla es incubada durante 2 horas a 37 °C. Posteriormente se le añaden 0,03 ml de solución de albúmina bovina (12 mg/ml) y 3 ml de ácido tricloracético al 10%. Se deja en hielo durante 15 minutos.

Transcurrido este tiempo, se filtran a vacío sobre filtros Millipore de 0,45  $\mu\text{m}$  de diámetro de poro y se lavan 3 veces con 5 ml, cada una, de ácido tricloracético al 5%. Los filtros se secan durante 12 minutos a 100 °C y una vez frío se introducen en el líquido de centelleo.

La técnica de Schleif (1981), con las modificaciones pertinentes de acuerdo a nuestras muestras es:

- (i) Como marcador radiactivo se emplea la Timidina tritiada 5'-trifosfato tetrasódica (metil- $^3\text{H}$ ), a una concentración de 0,5 nmoles por frasco ependorf.

Manteniendo el tubo ependorf en frío se le añade: Tabla 2.13. Incubándose el conjunto durante 5 minutos a 42°C.

- (ii) Se añade la muestra problema (40  $\mu\text{l}$ , con 0,4  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  en PBS. Con objeto de facilitar la reacción se añade en este paso 25  $\mu\text{g}$  de ARNt, incubándose durante 3 horas a 42 °C.
- (iii) Se toman diferentes muestras a los tiempos de 15, 30, 60 y 120 minutos, cogiendo 0,5  $\mu\text{l}$  y llevándolos a 200  $\mu\text{l}$  de tampón de ensayo compuesto de: Tabla 2.14.
- (iv) Transcurrido este tiempo se ponen los tubos en hielo y se les añade Albúmina bovina (20-500  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ), adicionándoles 2 ml de ácido Tricloracético al 5% a 4 °C. Se agita y se mantiene en hielo durante 10 minutos.
- (v) Parada la reacción, se filtra a través de filtros de vidrio GF/C (Whatman), lavándose con ácido Tricloracético al 1% a 4 °C. Tras este lavado con tricloracético al 1%, los filtros fueron lavados con Etanol al 95%, secándose con la ayuda de una lámpara de infrarrojos.

Finalmente, se procedió al conteo en líquido de centelleo del material radiactivo precipitado, mediante un equipo Beckman (LS 7500) de centelleo beta. Para ello, los filtros se introdujeron en viales de plástico llenos de líquido de centelleo, como se describe en el apartado siguiente.

Tabla 2.13: Solución para añadir al tubo ependorf en frío, tras el marcador radiactivo, según la técnica de Schleif (modificada)

* 11.5 $\mu$ l	agua bidestilada estéril	
* 5.0 $\mu$ l	solución salina 5x	
	** 250 mM	Tris-ClH pH=8,2
	** 50 mM	MgCl <sub>2</sub> (Merck)
	** 500 mM	KCl (Merck)
	** 2 mM	Ditiotreitol (Sigma)
* 0,5 $\mu$ l	Pirofosfato sódico 200 mM	
* 3,0 $\mu$ l	Iniciador 10x (Poly AdT12-18 100 $\mu$ g/ml)	
* 5,0 $\mu$ l	Trifosfatos 5x (5 mM de dGTP, dATP, dCTP)	

Tabla 2.14: Tampón de ensayo

* 400 $\mu$ g/ml	de Albúmina bovina
* 10 mM	de EDTA
* 2%	de SDS

## 14 TECNICAS DE CENTELLEO LIQUIDO.-

Esta técnica se empleó para cuantificar el material radiactivo incorporado a DNA.

(i) Líquido de centelleo descrito por Byefeld y col. (1966): Tabla 2.15.

(ii) Método de P. Chandra: Tabla 2.16.

Tabla 2.15: Líquido de centelleo (Byefeld, 1966)

* PPO	6,00 g
* POPOP	0,01 g
* Tolueno	1000 ml

Tabla 2.16: Método de P. Chandra

* PPO	4,0 g
* POPOP	0,1 g
* Tolueno	1000 ml

## 15 INHIBIDORES DE LA TRANSCRIPTASA INVERSA.-

Como inhibidores de la transcriptasa inversa hemos empleado el ddCTP (Mitsuya y col., 1986; Chen, 1987) y la Suramina sódica (Mitsuya y col., 1984).

Para la selección de las concentraciones óptimas, donde las células no viesen afectado su crecimiento, se realizó previamente un cribado de concentraciones.

Las concentraciones seleccionadas fueron las siguientes:

- (i) ddCTP (Laboratorios Boheringer - Mannheim): Basándonos en los datos aportados por Chen (1987), y después de un screening de concentraciones, se empleó la concentración de 50  $\mu$ M, concentración a la cual los cultivos celulares no se ven afectados.
- (ii) Suramina sódica (Cedida por los Laboratorios Bayer): se empleó sobre cultivos celulares a la concentración de 100  $\mu$ g / ml. Esta concentración fue seleccionada después de la realización de un screening basado en las concentraciones dadas por Mitsuya y col. (1984) y Fantini y col. (1989).

### 15.1 Acción de los inhibidores de la Transcriptasa inversa sobre la reacción "in vitro".-

Los inhibidores y las concentraciones seleccionadas fueron probadas no solamente sobre los cultivos celulares, sino también sobre la propia reacción "in vitro" de transcriptasa inversa.

Para ello, se prepararon las concentraciones descritas anteriormente y tras disolverlas en agua bidestilada estéril, se añadieron a la muestra problema al inicio de la reacción.

Posteriormente, se realizó la reacción completa, determinándose por centelleo líquido la radiactividad presente en el material precipitable.

### 15.2 Acción de los inhibidores de la Transcriptasa - inversa sobre cultivos celulares infectados por *T. cruzi* "in vitro".-

Al objeto de conocer el efecto de los inhibidores de la transcriptasa inversa sobre el desarrollo intracelular de *T. cruzi*, procedimos a infectar unas células cultivadas en placas de microtitulación de fondo plano, donde previamente habíamos introducido cristales borosilicados y estériles.

Una vez que los cultivos estaban confluentes se infectaron durante 6 horas con formas metacíclicas de *T. cruzi*, en medio MEM sin SBFI. La purificación de las formas metacíclicas y el método de infección fue similar al descrito anteriormente.

Con estas células infectadas se realizaron 3 lotes, a los que se les añadió a los distintos tiempos, la concentración de ddCTP o Suramina sódica, disueltas en medio MEM sin suero.

- (i) Cultivos que después de las 6 horas de infección, se lavaron y se pusieron en contacto durante 2 horas, unos con suramina (100  $\mu\text{g}$  / ml), otros con ddCTP (50  $\mu\text{M}$ ), dejando otro grupo como control, al que se le adicionó un volumen similar de medio MEM sin suero.

Transcurrido este tiempo, los cultivos se lavaron para quitar los restos de los productos y se dejaron en medio MEM al 10% de SBFI hasta su sacrificio a las 24, 48 y 72 horas de dicho tratamiento.

- (ii) Cultivos que después de las 6 horas de infección se lavaron y se dejaron en medio MEM adicionado con un 10% de SBFI durante 15 horas.

Transcurrido este tiempo, se adicionó durante 2 horas a unos cultivos Suramina (100  $\mu\text{g}$  / ml), a otros ddCTP (50  $\mu\text{M}$ ), dejando un control al que se adicionó un volumen similar de medio MEM sin suero.

Pasadas las 2 horas, los cultivos se lavaron y se dejaron en medio MEM al 10% de SBFI hasta su sacrificio a las 24, 48 y 72 horas de dicho tratamiento.

- (iii) Cultivos que después de 6 horas de infección, se lavaron y se pusieron en contacto con los dos inhibidores de la transcriptasa inversa durante 15 horas,

dejando un control de la infección al que se le adicionó el mismo volumen de medio MEM sin suero.

Transcurrido este tiempo, los cultivos se lavaron y se dejaron en medio MEM adicionado con un 10% de SBF1 hasta su sacrificio a las 24, 48 y 72 horas de dicho tratamiento.

Una vez transcurridos los distintos tiempos se procedió al sacrificio de los cultivos infectados. Se fijaron por inmersión en metanol durante 30 segundos.

Seguidamente, los cristales se adhirieron sobre portas con DePeX y se tiñeron con Giemsa al 10%, procediéndose al recuento en microscopio óptico de al menos 300 células por cristal, calculando el porcentaje de parasitación (%P) y el índice parásito-célula (p/C).

## 16 OBTENCION DE cDNA CON TRANSCRIPTASA INVERSA.-

Se siguió el método de Schleif y col.(1981), método descrito para la síntesis de DNA marcado radiactivamente complementario a un RNA.

Para ello se prepararon las siguientes soluciones, todas ellas con agua bi-distilada estéril y esterilizadas posteriormente excepto el ditiotreitól, PolyA-dT, albúmina bovina y SDS.

- (i) Solución salina 5x. Está compuesta por: Tabla 2.17.
- (ii) Iniciador 10x. 100  $\mu$ g / ml de Poly A-dT12-18 (Boehringer Mannheim).

Tabla 2.17: Solución salina 5 ×

* Tris-ClH	250 mM pH 8,2
* $MgCl_2$	50 mM
* KCl	500 mM
* Ditiotritol	2 mM

(iii) Trifosfatos 5×. 5 mM de dGTP, dATP y dCTP (Boehringer Mannheim).

(iv) Tampón de ensayo. Está formado por: Tabla 2.18.

(v) Tampón de parada. Está compuesto por: Tabla 2.19.

El procedimiento consiste en añadir 0,5 nmoles de Timidina tritiada 5'-trifosfato tetrasódica en tubos ependorf de polipropileno. A los tubos mantenidos en hielo se les añade: Tabla 2.20.

(vi) Se incuba a 42 °C durante 5 minutos, adicionándosele 40 µl de la muestra problema, en nuestro caso fue la fracción correspondiente al segundo pico de núcleos parasitados pasados por una columna de Sepharosa - Ig G procedentes de un suero de ratones inmunizados frente a núcleos de células HeLa infectadas con formas metacíclicas de *T. cruzi*. Se incuba durante 5 horas a 42 °C.

(vii) Transcurrido este tiempo los tubos se pasan a 0 °C en hielo en fusión, y se les añaden 200 µl de tampón de parada, 30 µg de RNAt, 200 µl de Acetato amónico 5M y 3 volúmenes de etanol de 95% a -20 °C, almacenándose durante toda la noche a -20 °C.

(viii) Seguidamente, los tubos son centrifugados durante 10 minutos a 10.000

Tabla 2.18: Tampón de ensayo

* Albúmina bovina	400 µg / ml
* EDTA	10 mM
* SDS	2%

Tabla 2.19: Tampón de parada

* EDTA	10 mM
* SDS	0,1%
* Acetato amónico	0,2 M a pH 5,0



Tabla 2.20: Solución a añadir a los tubos mantenidos en hielo

* 11,5 $\mu$ l	agua bidestilada estéril
* 5,00 $\mu$ l	solución salina 5x
* 0,50 $\mu$ l	Pirofosfato sódico 200 mM
* 3,00 $\mu$ l	Iniciador 10x
* 5,00 $\mu$ l	Trifosfatos 5x

r.p.m., desechándose el sobrenadante con cuidado y el sedimento se resuspende en 300  $\mu$ l de TE (EDTA 1 mM y Tris-ClH 10 mM, pH 8,0) a los que se les añaden 10  $\mu$ l de NaOH 10 M, al objeto de hidrolizar el RNA, incubándose durante 2 minutos a 100  $^{\circ}$ C.

Posteriormente se transfiere a un baño de hielo. Se neutraliza adicionando 9  $\mu$ l de ClH 10 M y pequeños volúmenes de ClH 2 M hasta conseguir un pH de 7,0. Se agita con cuidado cada vez que añadimos ácido.

- (ix) Una vez neutralizada la mezcla, se almacena durante toda la noche a -20 $^{\circ}$ C con 2 volúmenes de Etanol al 95%.

El botón nuevamente recogido mediante centrifugación a 10.000 r.p.m. durante 10 minutos, se lava con etanol al 70% a -20  $^{\circ}$ C, se vuelve a centrifugar, eliminando el sobrenadante y secando las paredes del tubo. El botón recogido se resuspende en 200  $\mu$ l de TE (10 mM de Tris-ClH pH 8,0 y 1 mM de EDTA).

## 17 ELECTROFORESIS DE AGAROSA.-

Se prepara siguiendo el protocolo de Maniatis (1982). Esta técnica permite separar fragmentos de DNA de distintos tamaños, que no pueden separarse adecuadamente por otras técnicas, como es la centrifugación en gradiente de densidad.

Además, el DNA en el gel se localiza directamente: las bandas de DNA se visualizan en el gel tras el tratamiento del mismo con Bromuro de Etidio, sustancia intercalante y fluorescente a la luz ultravioleta (Sharp, 1973).

La separación electroforética depende de una serie de parámetros como son:

---

Ma. N. Rodriguez Cabezas

- (i) Peso molecular del DNA, en función del número de pares de bases.
- (ii) Concentración de agarosa en el gel. Existe una relación lineal entre el logaritmo de la movilidad electroforética ( $u$ ) y la concentración del gel ( $T$ ), la cual viene descrita por la siguiente ecuación:

$$\log u = \log u_0 - \log KrT$$

- (iii) Conformación del DNA. Hay que tener en cuenta si es DNA lineal o circular.
- (iv) El voltaje al que se desarrolla el corrido.
- (v) La temperatura de corrido.

El gel de agarosa fue preparado de la siguiente manera:

- (i) Se pesó 1,5% de agarosa (LKB), disolviéndose el tampón TAE al 1%.
- (ii) Tampón TAE (Tris-Acetato- EDTA) 10 ×/litro: Tabla 2.21.

La suspensión se funde durante 2 minutos en un horno microondas, dejándose enfriar, una vez fundida la agarosa, hasta 45 °C (temperatura de fusión de la misma). Posteriormente, se vierte en la placa del gel con el peine formador de pocillos, dejándose solidificar lentamente.

Transcurrido este tiempo, el gel se pone sobre la cubeta de electroforesis, bañándolo con tampón de corrido (TAE al 1%)

Para la preparación de las muestras, éstas se disolvieron en el tampón de muestra formado por: Tabla 2.22.

Tabla 2.21: Tampón TAE

* Tris-ClH	48,50 g
* Acido acético glacial	11,42 ml
* EDTA (5 M)	20 ml

Se añaden a cada pocillo 15  $\mu$ l de la muestra, corriéndose la electroforesis durante 4 - 5 horas a 50 V mediante una fuente de alimentación LKB (modelo 2303 Multiridrive XL).

Una vez finalizada la electroforesis, el gel se transfiere a un baño de bromuro de etidio (0,5  $\mu$ g / ml) durante 45 minutos. Transcurrido este tiempo, se le da al gel un breve lavado en agua destilada y se observa en un transiluminador (Fotodyne Incorporated 3-3002) a luz ultravioleta.

Tabla 2.22: Tampón de muestra para la preparación de las muestras (+Tris-ClH 10 mM y EDTA 1 mM, pH 8)

* 50,0%	Glicerol
* 0,25%	Azul de Bromofenol
* 49,7%	Medio TE+

## 18 MARCAJE NO RADIATIVO DE DNA.-

Hemos utilizado el kit de marcaje no radiactivo de los laboratorios Boheringer - Mannheim Fig.- 2.1. Este método se basa en que el DNA se marca por incorporación al azar de dUTP-marcado con digoxigenina (Feinberg y col. 1983). El dUTP se encuentra ligado, via "spacer - arm" a un hapteno esteroideo de digoxigenina (Dig-UTP).

Después de la hibridación al DNA diana o blanco, los híbridos se detectan por inmunoensayo enzimático empleando un anticuerpo conjugado (conjugado de antidigoxigenina fosfatasa alcalina), detectándose color por una reacción con 5- bromo -4 -cloro -3 indolil fosfato (X-fosfato) y nitroazul de tetrazolio (NBT).

El método de marcaje de DNA permite el marcaje de pequeños (10 pg) o grandes cantidades (más de 8  $\mu$ g) de DNA por ensayo. Los fragmentos de DNA aislados de agarosa de bajo punto de fusión se marcan también de una forma efectiva.

La reacción de marcaje es rápida y hay una incorporación de digoxigenina cada 20-25 nucleótidos en el DNA sintetizado de "novo". El tamaño de los fragmentos marcados depende del DNA de partida. Así, este kit permite la detección de 0,1 pg de DNA homólogo.

La técnica de marcaje fue la siguiente:

- (i) Se pueden marcar por cada reacción de 10 ng-3  $\mu$ g de DNA lineal. Cantidades mayores pueden marcarse por aumento a escala de todos los componentes y volúmenes. Se recomienda purificar el DNA lineal por extracción con cloroformo / fenol y posterior precipitación con Etanol.
- (ii) Si es DNA de doble cadena, debe desnaturalizarse en un baño de agua a 95  $^{\circ}$ C durante 10 minutos, refrigerando rápidamente en hielo. La desnaturalización debe ser completa.
- (iii) En un tubo de microfuga, que empleamos como control del marcaje, ponemos:
  - \* 1  $\mu$ g de DNA desnaturalizado fresco correspondiente a 5  $\mu$ l de DNA control.
  - \* 2  $\mu$ l de mezcla de hexanucleótidos (dATP, dCTP y dGTP a 1 mmol/l y dTTP a 0,65 mmol/l).
  - \* 2  $\mu$ l de hexanucleótidos marcados (dATP, dCTP y dGTP a 1mmol/l, dTTP a 0,65 mmol/l y digUTP a 0,35 mmol/l).
  - \* Se completa hasta 19  $\mu$ l con agua bidestilada estéril. Se adiciona 1  $\mu$ l de Enzima de Klenow con un grado de marcaje de 2 U/ $\mu$ l.
- (iv) Otro tubo se prepara igual pero con nuestro DNA problema.
- (v) Ambos tubos se incuban a 37  $^{\circ}$ C durante al menos 1 hora. Mayor tiempo de incubación (hasta 20 horas), puede incrementar la cantidad de ADN marcado.

Tabla 2.23: Disolución del botón seco al vacío

* Tris-ClH pH 8	10 mM
* EDTA	1 mM

Transcurrido este tiempo, la reacción se para adicionando 2  $\mu$ l de una solución de EDTA 0,2 M a pH 8. El DNA así marcado, se precipita con CILi 4 M y 75  $\mu$ l de Etanol al 95% precongelado a -20  $^{\circ}$ C. Se mezcla todo bien y se deja al menos 30 minutos a -70  $^{\circ}$ C o 2 horas a -20  $^{\circ}$ C.

- (vi) Transcurrido este tiempo, se centrifuga a 12.000 g y el botón se lava con Etanol al 70% (v/v) previamente enfriado a -20  $^{\circ}$ C. Se seca el botón a vacío y se disuelve en 50  $\mu$ l de: Tabla 2.23.

La cantidad de DNA marcado sintetizado de "novo" depende de la cantidad y pureza del DNA patrón. En la reacción standar, con 1  $\mu$ g de DNA por ensayo aproximadamente, el 10% de los nucleótidos son incorporados sobre 250 ng de DNA.

Las reacciones con menor cantidad de DNA patrón (30 ng) resultan en una relación 1:1 de DNA marcado y no marcado.

La cantidad de DNA marcado generado puede ser aproximado por comparación con el DNA control marcado, en hibridación o detección directa.

## 19 LECTURA DEL MARCAJE DE DNA POR DETECCION INMUNOLOGICA.-

El color de la reacción se inicia a pH alcalino por la adición de X-fosfato y NBT. Un precipitado azul comienza a formarse en pocos minutos y continua hasta 3 días. La reacción se puede dar por terminada a las 24 horas.

El procedimiento seguido fue el siguiente:

---

Ma. N. Rodriguez Cabezas

(i) Un DNA marcado con concentración conocida ( $0,4 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ ), se emplea como control. Se prepara a las diluciones de 1/10, 1/100, 1/1.000, 1/10.000 y 1/100.000.

(ii) Sobre una membrana de nylon (Hybond, de  $0,45 \mu\text{m}$ ) se pone:

\*  $1 \mu\text{l}$  de cada una de las diluciones del DNA marcado control.

\*  $1 \mu\text{l}$  de DNA control de la reacción de marcaje.

\*  $1 \mu\text{l}$  de supuesto cDNA de núcleos de células no parasitadas.

\*  $1 \mu\text{l}$  del supuesto cDNA desde núcleos de células parasitadas.

Estos DNA se fijan a la membrana de nylon por calentamiento durante 2 horas a  $80 \text{ }^\circ\text{C}$  o por transiluminación con luz ultravioleta durante 3 minutos (Kbandjian, 1987).

(iii) Una vez fijados sobre las membranas, éstas se lavan durante 1 minuto con la solución I compuesta por: Tabla 2.24.

Tabla 2.24: Solución I para lavar las membranas en las que se han fijado los DNA

* Tris-ClH	100 mM	pH 7,5
* NaCl	150 mM	

Incubándose posteriormente durante 30 minutos con 100 ml de la solución de reactivo de bloqueo (kit) al 0,5% en la solución I.

(iv) Transcurrido este tiempo, las membranas se lavan durante 1 minuto con la solución I y se incuban durante 30 minutos con 20 ml de Conjugado-Anticuerpo (anticuerpos de oveja antidigoxigenina-Fab, conjugados con fosfatasa alcalina).

(v) Transcurrido ese tiempo, se quita el anticuerpo-conjugado no ligado mediante 2 lavados de 15 minutos cada uno con 100 ml de solución I. Después de estos lavados, se equilibran las membranas durante 2 minutos con 20 ml de : tabla 2.25.

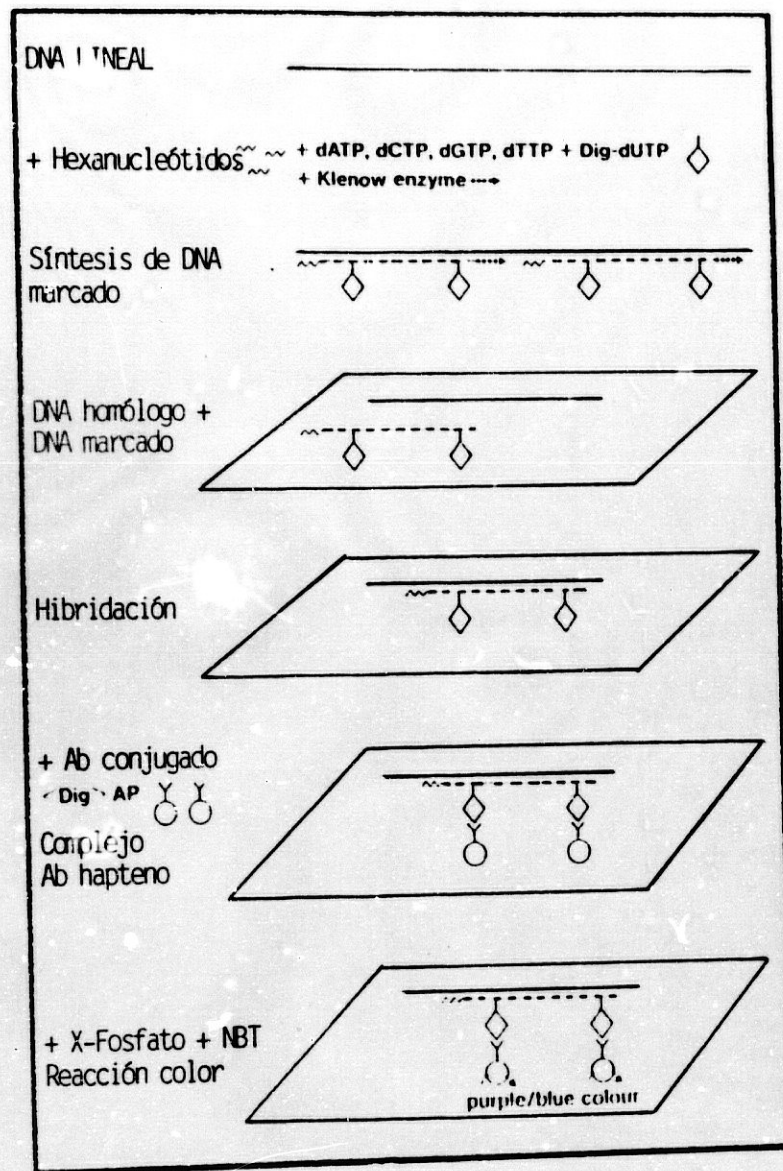


Figura 2.1: Kit de marcaje de DNA no radiactivo. (Laboratorios Boehringer - Mannheim)

Tabla 2.25: Solución para equilibrar las membranas tras los lavados (20 ml)

* Tris - ClH pH 9,5	100 mM
* NaCl	100 mM
* $MgCl_2$	50 mM

Incubándose las membranas posteriormente con 10 ml de la solución de color compuesta por:

\* 45  $\mu$ l de NBT (nitroazul de tetrazolio 75 mg/ml de dimetilformamida).

\* 35  $\mu$ l de X-fosfato (5- bromo -4- cloro -3 indolilfosfato 50 mg/ml de dimetilformamida 10 ml de la solución anterior.

Este proceso de coloración se realiza en bolsas de plástico selladas o en una caja apropiada en oscuridad. El color comienza a aparecer a los pocos minutos, y la reacción está completa a las 24 horas. No debe agitarse mientras se está desarrollando el color.

Cuando se detectan las bandas deseadas, se para la reacción lavando las membranas durante 5 minutos con 50 ml de la solución de: TE

El resultado fue fotocopiado anotándose las concentraciones de DNA y los resultados obtenidos

## 20 PRESENCIA DE VIRUS EN *T. CRUZI*.-

Para poder poner de manifiesto la presencia o ausencia de virus en *T. cruzi*, se partió de un cultivo de formas epimastigotas de *T. cruzi* en medio LIT.

Cuando se encontraba en su mayor crecimiento este cultivo se centrifugó a 1000 g durante 15 minutos en una centrífuga Beckman (J2-21M), con un rotor J 20.

Transcurrido este tiempo, los parásitos se sonicaron y el lisado se clarificó mediante una centrifugación de 30 segundos en una microcentrífuga en frío. Una vez clarificado, el lisado se suspendió en medio TNE a una concentración final de 0,5x y CsCl al 33% (p/p).



En este gradiente de CsCl, se centrifuga durante 16 horas a 50.000 g en una ultracentrífuga Beckman (L8 70 M) con un rotor 50 Ti a 4 °C.

Transcurrido este tiempo, se recogieron las fracciones que presentaban mayor absorbancia a 260 nm. Estas fracciones se dializaron frente a TNE 0,5x y se procesaron para realizar microscopía electrónica.

## 21 TINCIÓN NEGATIVA EN MICROSCOPIA ELECTRONICA.-

La preparación del material necesario así como la obtención de las muestras y su procesamiento para examinarlas al microscopio electrónico, se llevaron a cabo siguiendo técnicas generales.

Esta tinción consiste en que los objetos particulados que carecen del contraste suficiente para observarlos directamente al microscopio, se incrustan en una película de material denso a los electrones.

Cuando se observan al microscopio electrónico aparecen como objetos claros sobre fondo oscuro (de ahí el nombre de tinción negativa). Es un método particularmente adecuado para virus y moléculas.

### 21.1 Preparación del soporte: Rejillas con Formvar -Carbón.-

Se han empleado rejillas de cobre de 300-400 mallas. Para la película plástica, se ha utilizado el Formvar (polivinil-formol), disuelto al 0,25 o al 0,30% en cloroformo para microscopía (Merck).

El procedimiento seguido para colocar la película plástica sobre las rejillas fue el siguiente: se toma un portaobjetos perfectamente limpio y seco y se sumerge en la solución de Formvar, retirándolo inmediatamente y dejándolo escurrir y secar sobre la solución, en posición vertical. De esta forma se evita el que durante el secado absorba humedad y se formen agujeros en la película.

Seguidamente se cortan los bordes de la película, raspando los bordes del portaobjetos con una cuchilla. Esta operación debe realizarse lo más cuidadosamente posible para evitar que la película se ensucie con partículas de vidrio.

A continuación se desprende la película del portaobjetos, haciéndola flotar sobre agua destilada. Para ello, se introduce el portaobjetos por su borde de menor longitud, muy lentamente en el agua, vigilando si la película se desprende uniformemente.

Una vez que la película está flotando sobre el agua, se disponen las rejillas sobre ella, con la superficie mate en contacto con la película.

Finalmente, para extraer la película con las rejillas adheridas, se deposita un trozo de papel de filtro sobre la citada película, dejándolo estar hasta que se empape de agua totalmente, sacándolo y dejándolo secar en una caja Petri a 37 °C.

Posteriormente, se procede a cubrir la película con una capa de carbón, lo que se lleva a cabo en un evaporador Hitachi HUS-4B, haciendo pasar una intensidad de corriente de 40 amperios por los electrodos de carbón durante 1-2 minutos.

## 21.2 Preparación de las muestras.-

El lisado de formas epimastigotas de *T. cruzi*, una vez procesado como se detalla en el capítulo 2.20., se empleó para la preparación de las muestras para microscopía electrónica. Se recogieron las fracciones de un gradiente de CsCl que presentaron mayor absorbancia a 260 nm.

Estas fracciones se dializaron, liofilizaron y posteriormente se resuspendieron en un volumen de 0,5 ml de medio TNE 1x, dejándolas listas para su montaje en la rejilla.

### 21.3 Tinción.-

Los materiales que se emplean para las tinciones negativas tienen que tener una densidad electrónica alta, no deben tener estructura fina y deben ser estables al haz de electrones.

Así, se emplean sustancias como el ácido fosfotúngstico, molibdato amónico, siendo los de mayor contraste las sales de uranilo, tales como acetato, formiato y oxalato.

En nuestro caso, hemos empleado el acetato de uranilo al 1%. Tiene el inconveniente de que precipita en presencia de la luz.

### 21.4 Montaje de las muestras en las rejillas y tinción.-

El procedimiento consistió en depositar gotas de las suspensiones sobre las rejillas, dejándolas estar durante 1-2 minutos, y retirando a continuación el exceso con un papel de filtro.

De esta forma queda sobre la rejilla una película muy fina de la suspensión, que se deja secar protegida del polvo.

Para la tinción se procedió de un modo semejante. Se colocó una gota de acetato de uranilo al 1%, retirando el exceso con ayuda de un papel de filtro. Se dejó secar al aire y por último se lavó con agua destilada.

Conviene dejar secar las rejillas antes de ser introducidas en la columna del microscopio electrónico, pues de otra forma, la rejilla resultará dañada.

Para la observación de las muestras se empleó un microscopio electrónico (Zeiss M-10-C) con unos aumentos de 50000 y 120000.

## 22 DETECCION INMUNOLOGICA DEL VIRUS CON UN SUERO FRENTE A T. CRUZI.-

La fracción obtenida mediante gradiente de cloruro de cesio, de formas epimastigotas de *T. cruzi*, en la cual determinamos la presencia de virus mediante tinción

negativa para microscopía electrónica, fue puesta en contacto con cultivos de células HeLa, en medio MEM con un 10% de SBFI, durante 24, 48 y 72 horas.

Estos cultivos de células HeLa se realizaron sobre placas de microtitulación de fondo plano provistas de cubreobjetos borosilicados, redondos y estériles.

Transcurridos estos tiempos, los cultivos fueron divididos en dos lotes: un primer lote de células HeLa no tratadas y células HeLa tratadas durante 24, 48 y 72 horas con dicha fracción, las cuales se fijaron con metanol durante 30 segundos y se tiñeron con Giemsa al 10%.

Y un segundo lote formado por células HeLa no tratadas y células HeLa tratadas durante 24, 48 y 72 horas con dicha fracción, las cuales se fijaron con acetona durante 10 minutos a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ , y se procesaron para realizar una inmunofluorescencia indirecta frente a un suero antitrypanosoma titulado anteriormente.

Este suero antitrypanosoma, además, fue adsorbido sobre una capa de células HeLa fijadas con acetona durante 12 horas a temperatura ambiente.

Después de la fijación con acetona a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 10 minutos, se permeabilizaron con Triton X-100 al 0,1% v/v en PBS durante 10 minutos. Transcurrido este tiempo, las células se incubaron durante 1 hora a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  con una dilución 1/100 del suero antitrypanosoma cruzi.

Tras la incubación, las células fueron sometidas a 5 lavados de 10 minutos cada uno, con PBS conteniendo tween 20 al 0,05% v/v, incubándose posteriormente durante 30 minutos a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  con un anticuerpo antisuero de ratón obtenido en oveja, marcado con fluoresceína, diluido al 1/60 como especifica la casa comercial (Boheringer) en PBS conteniendo 1/10.000 de Azul de Evans (Sigma).

Transcurridos los 30 minutos de incubación en cámara húmeda, se realizaron, 5 lavados de 10 minutos cada uno, con PBS-tween 20 a la concentración de 0,05% v/v, montándose las preparaciones en glicerina tamponada al 10%, para su observación al microscopio de fluorescencia (Olympus BH 2 RFCA).

**23 MEDIDA DE LA TRANSCRIPTASA INVERSA EN  
LA FRACCION OBTENIDA POR ULTRACENTRI-  
FUGACION.**

Un lisado de formas epimastigotas de *T. cruzi*, se sonicó y se sometió a una centrifugación en gradiente de cloruro de cesio, recogándose aquellas fracciones con mayor absorbancia a 260 nm y se realizó un estudio para poner de manifiesto la presencia de virus mediante tinción negativa.

Sobre estas fracciones se realizó una medida de la transcriptasa inversa, siguiendo la metodología de Schleif y col. (1981), tal como se ha descrito en apartados anteriores.

En dicha medida se empleó como marcador radiactivo la Timidina 5'trifosfato tetrasódica (metil-<sup>3</sup>H), procediéndose posteriormente a la precipitación con ácido tricloracético al 5% y medida en un contador Beckman (LS 7500) en líquido de centelleo.

Además de esta fracción se preparó un control de líquido de centelleo y un control como blanco de la reacción, en el cual se añadió todo y en el lugar de la fracción problema, se le añadió el mismo volumen de media TNE al 0,5%, medio en el que estaba disuelta la fracción problema.

---

## RESULTADOS

---

### 3.1 OBTENCION DE NUCLEOS DE CELULAS HeLa PARASITADAS POR *T. CRUZI*.-

Una vez obtenidos los núcleos de células HeLa parasitadas por *T. cruzi*, tal como se redacta en la sección correspondiente, estos núcleos se lavaron con solución de sacarosa 0,25 M , quedando ya listos para su procesamiento.

Para comprobar la ausencia de formas amastigotas de *T. cruzi* junto con los núcleos de las células HeLa, una muestra de los mismos fué depositada sobre un portaobjetos previamente humedecido con suero bovino fetal inactivado. Esta muestra fué teñida con Giemsa al 10%, y se observó al microscopio óptico. Fig. 3.1 y Fig. 3.2.

Para la obtención de los núcleos, se parte de células HeLa parasitadas durante 6 horas con formas metacíclicas de *T. cruzi*, sacrificadas a las 15 horas de dicha infección.



Figura 3.1: Núcleos de células *HeLa* parasitadas, durante el proceso de purificación.



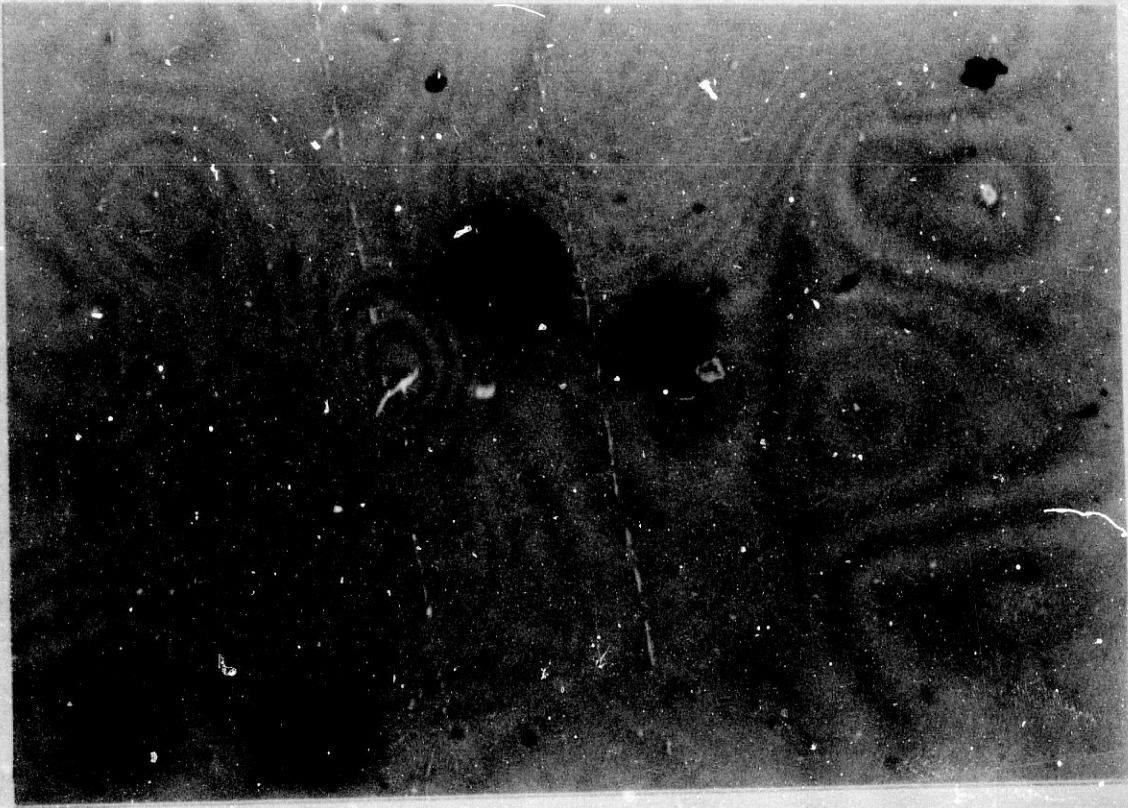


Figura 3.2: Núcleos de células HeLa parasitadas, ya purificados.

---

Ma. N. Rodríguez Cabezas

Tabla 3.1: Titulación de los distintos sueros antinúcleos de células HeLa parasitadas por *T. cruzi*. TABLA I Suero A: Suero de ratones inmunizados frente a núcleos de células HeLa parasitadas por *T. cruzi*, sonicados e incluidos en liposomas. Suero B: Suero de ratones inmunizados frente a núcleos de células HeLa parasitadas por *T. cruzi*, sonicados, con coadyuvante de Freund. Suero C: Suero frente a coadyuvante de Freund.-

	SUERO A	SUERO B	SUERO C
Células HeLa no parasitadas	(-)	(-)	(-)
Células HeLa parasitadas y sacrificadas a las 2 h	(-)	(-)	(-)
Células HeLa parasitadas y sacrificadas a las 12h	1/50	1/80	(-)
Células HeLa parasitadas y sacrificadas a las 48h	1/50	1/80	(-)
<i>T. cruzi</i>	1/40	1/40	(-)

### 3.2 TITULACION DE LOS DISTINTOS SUEROS ANTINUCLEOS DE CELULAS HeLa PARASITADAS POR T. CRUZI.-

Los sueros de ratones inmunizados frente a núcleos de células HeLa parasitadas por *T. cruzi*, mediante liposomas o coadyuvante de Freund, fueron adsorbidos sobre un cultivo de células HeLa no parasitadas, fijadas con acetona. Una vez realizado ésto, los distintos sueros fueron titulados mediante una técnica de inmunofluorescencia indirecta (IFI) frente a :

- (i) Células HeLa no parasitadas.
- (ii) Células HeLa parasitadas por formas metacíclicas de *T. cruzi* durante 2 horas, y sacrificadas inmediatamente después de la infección.
- (iii) Células HeLa parasitadas por formas metacíclicas de *T. cruzi* durante 2 horas, y sacrificadas a las 12 horas de la infección.
- (iv) Células HeLa parasitadas por formas metacíclicas de *T. cruzi* durante 2 horas y sacrificadas a las 48 horas de la infección.
- (v) Formas metacíclicas de *T. cruzi*. (Tabla 3.1 y Fig. 3.3, Fig. 3.4 y Fig. 3.5).



*Figura 3.3: Titulación de los sueros frente a núcleos de células HeLa parasitadas por T. cruzi. Estudios realizados sobre células HeLa no parasitadas (a)*

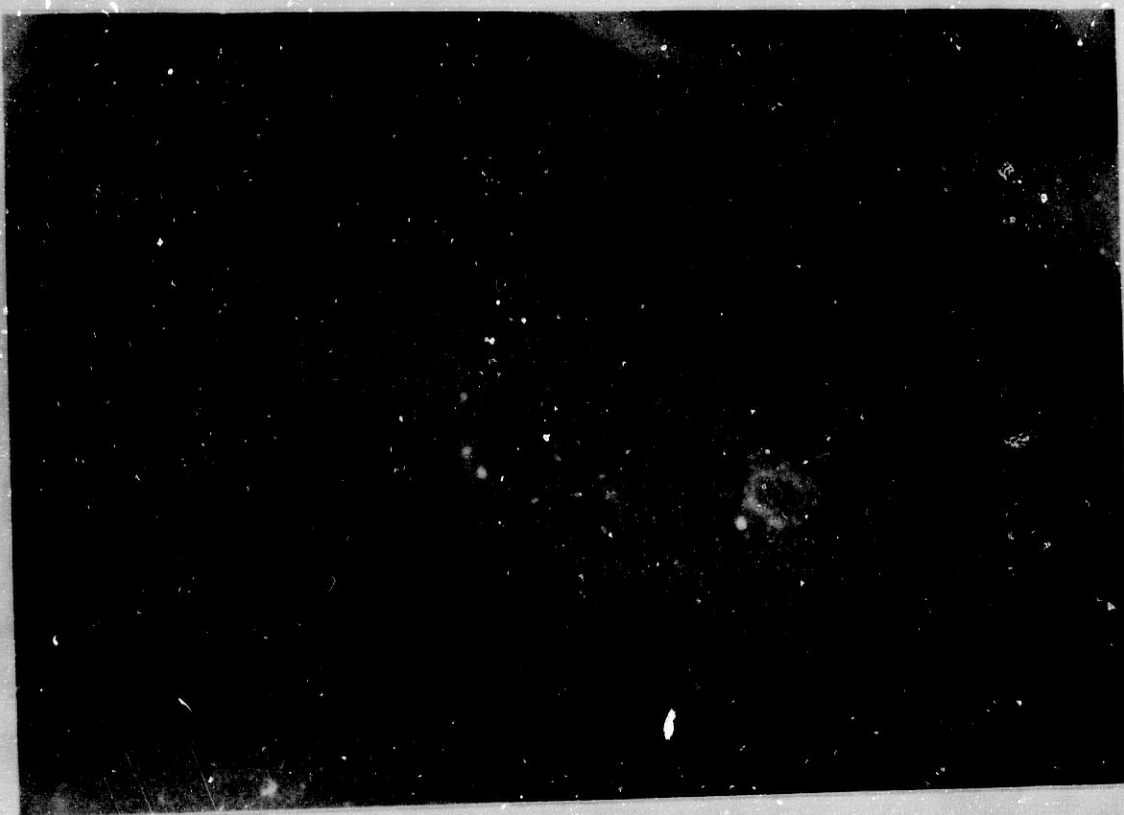


Figura 3.4: Titulación de los sueros frente a núcleos de células HeLa parasitadas por *T. cruzi*. Estudios realizados sobre células HeLa parasitadas por *T. cruzi* (b).



Figura 3.5: *Titulación de los sueros frente formas de T. cruzi (c).*



### 3.3 CROMATOGRAFIA DE AFINIDAD EN COLUMNA DE SEPHAROSA - PROTEINA A.-

Tras obtener los sueros de ratones inmunizados frente a núcleos de células HeLa parasitadas por *T. cruzi*, se procedió a la separación de las Inmunoglobulinas G (Ig G) de dichos sueros mediante una cromatografía de afinidad de Sepharosa CL 4B - Proteína A, tal como se detalla en el apartado correspondiente de Material y Métodos. Dicha columna se empleó para la separación de Ig G tanto de ratones normales como de ratones inmunizados frente a núcleos de células HeLa parasitados por *T. cruzi*.

En todos los casos, el flujo de la columna de Sepharosa - Proteína A fué de 35-40 ml/hora. Al cromatografiar el suero total, por la absorbancia del mismo, se obtiene un pico correspondiente a las proteínas del suero no ligadas a la proteína A. Tras obtener un registro en que la absorbancia disminuye hasta la línea basal inicial, la columna fué eluida con tampón citrato a pH 4, conteniendo 0,5 M de ClNa.

Con el cambio de pH, las Ig G acopladas a la proteína A, se desligan de la misma, obteniendo una segunda fracción. Fig. 3.6.

Con las fracciones obtenidas se procedió a la realización de una electroforesis en gel de SDS - Poliacrilamida y posterior tinción con nitrato de plata.

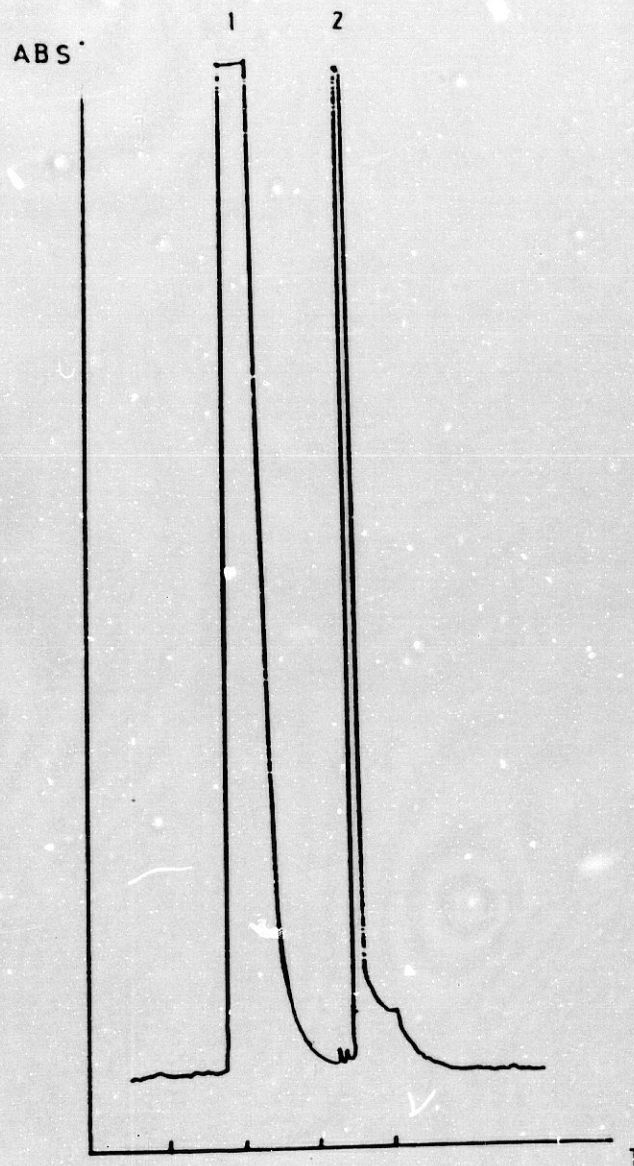


Figura 3.6: Obtención de las Ig G de los sueros de ratón frente a núcleos de células HeLa parasitadas por *T. cruzi* mediante cromatografía de afinidad de Sepharosa - proteína A.



**3.4 DESARROLLO EN GEL DE SDS- POLIACRILAMIDA DE LAS FRACCIONES OBTENIDAS EN LA SEPARACION DE LAS Ig G DE LOS SUEROS DE LOS RATONES INMUNIZADOS FRENTE A NUCLEOS DE CELULAS HeLa PARASITADAS POR T. CRUZI.-**

Tras el desarrollo de las electroforesis, se obtuvieron una serie de bandas, las cuales se encontraban en núcleos de células parasitadas y no aparecían en núcleos de células no parasitadas.

Las muestras fueron:

- (i) Patrón de pesos moleculares compuesto por Albúmina bovina (66 Kd), Albúmina de huevo (45 Kd) y Lisozima (14.3 Kd).
- (ii) Fracción del suero de ratones frente a núcleos de células HeLa parasitadas por *T. cruzi* que no se ha ligado a la columna de cromatografía de Sepharosa - Proteína A.
- (iii) Fracción del suero frente a núcleos de células HeLa parasitadas por *T. cruzi* que se ligó a la columna de Sepharosa - Proteína A. Fig. 3.7.



Figura 3.7: *Electroforesis de SDS - poliacrilamida de las fracciones obtenidas por cromatografía de afinidad de los sueros antinúcleos de células parasitadas.*

### 3.5 CROMATOGRAFIA DE AFINIDAD EN COLUMNA DE SEPHAROSA CL4B - Ig G.-

Tras la unión de las inmunoglobulinas G obtenidas de sueros de ratones inmunizados frente a núcleos de células HeLa parasitadas por *T. cruzi* (Ig Gp) a la Sepharosa CL4B, se procedió a la separación de las fracciones de un sonicado de núcleos de células HeLa no parasitadas y parasitadas por *T. cruzi* que se ligaban o no por afinidad a dicha columna. Fig. 3.8 y Fig. 3.9.

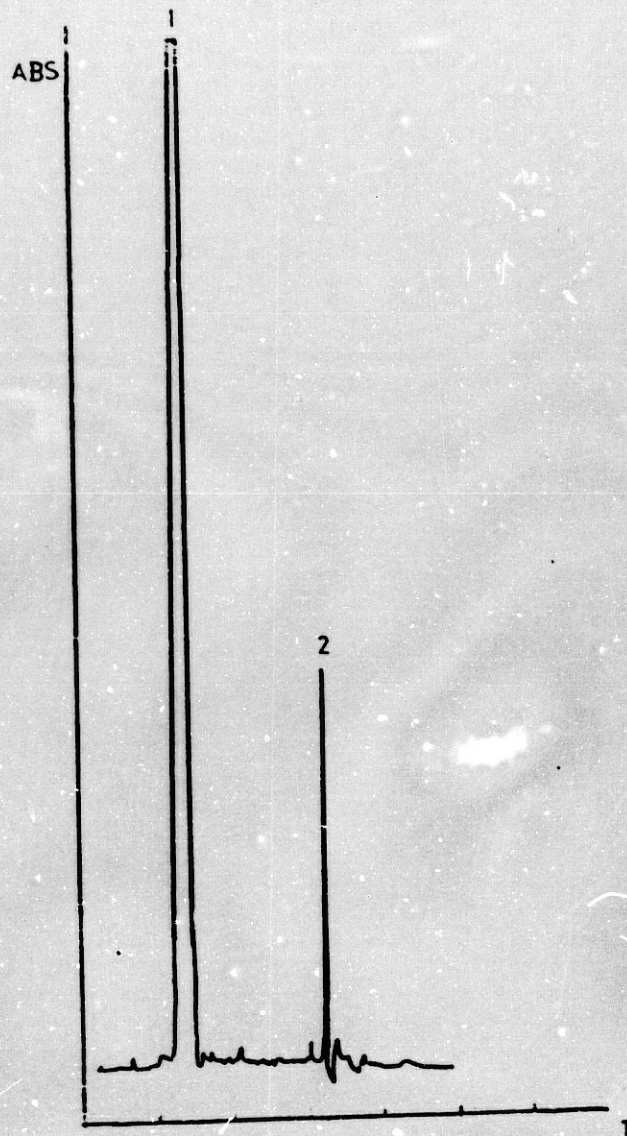


Figura 3.8: Cromatografía de afinidad en columna de Sepharosa - Ig Gp de núcleos de células HeLa no parasitadas.

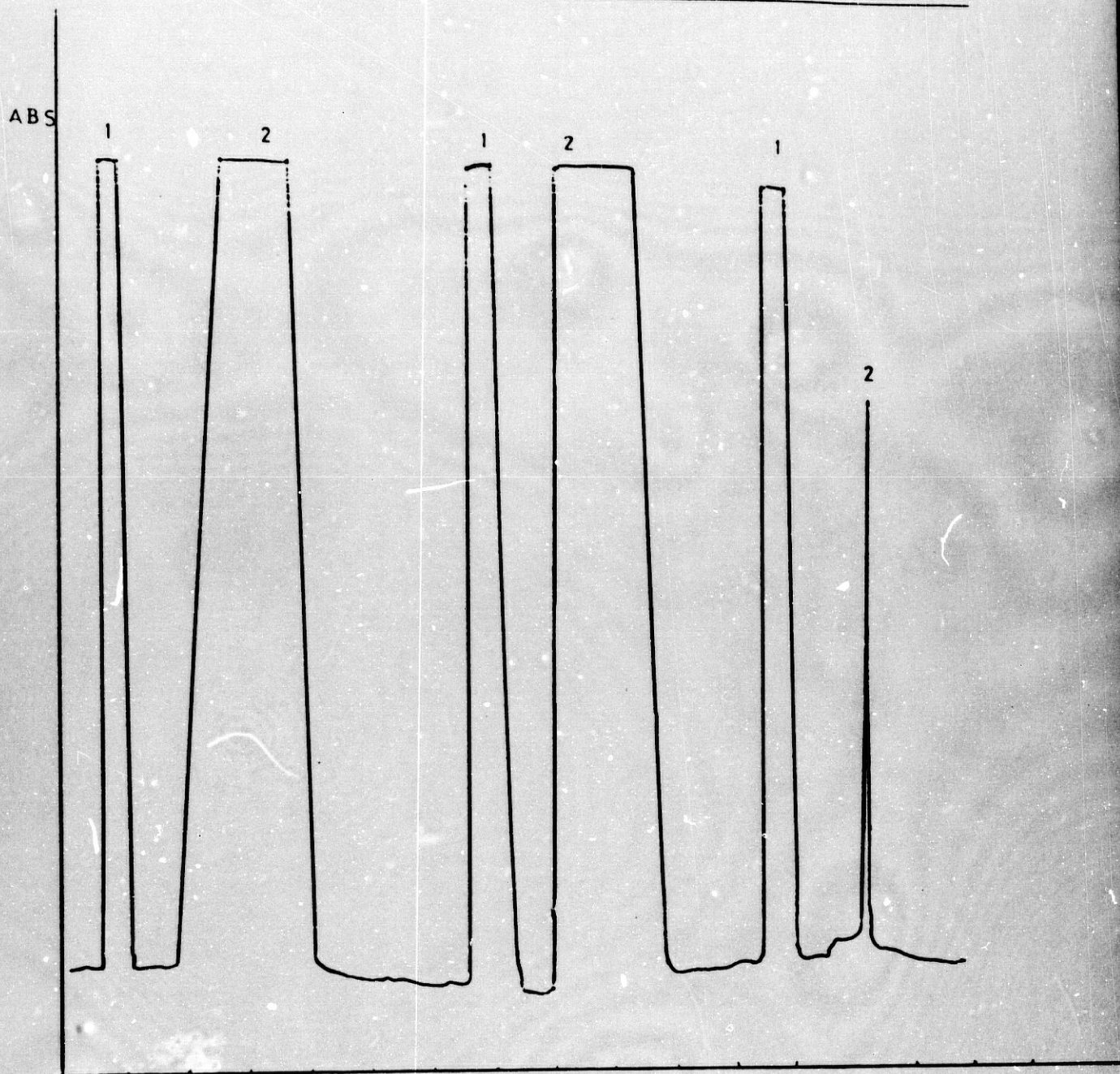


Figura 3.9: Cromatografía de afinidad en columna de Sepharosa - Ig Gp de núcleos de células HeLa parasitadas por *T. cruzi*.

**3.6 DESARROLLO EN GEL DE SDS-POLIACRILAMIDA DE LAS FRACCIONES OBTENIDAS EN LA SEPARACION DE LAS PROTEINAS DE NÚCLEOS DE CELULAS HeLa PARASITADAS POR T. CRUZI POR CROMATOLOGRAFIA DE AFINIDAD EN UNA COLUMNA DE SEPHAROSA - Ig Gp.-**

Para realizar la electroforesis en gel de poliacrilamida se siguió la técnica descrita anteriormente. Las muestras fueron las siguientes:

- (i) Patrón de pesos moleculares compuesto por Albúmina bovina (66 Kd), Albúmina de huevo (45 Kd) y Lisozima (14.3 Kd).
- (ii) Fracción de suero frente a núcleos de células HeLa parasitadas por *T. cruzi* que no ligó a la columna de Sepharosa CL4B - Proteína A.
- (iii) Fracción de suero frente a núcleos de células HeLa parasitadas por *T. cruzi* que ligó a la columna de Sepharosa CL4B - Proteína A.
- (iv) Fracción de núcleos de células HeLa parasitadas por *T. cruzi* que no ligó a la columna de Sepharosa CL4B - Ig Gp.
- (v) Fracción de núcleos de células HeLa parasitadas por *T. cruzi* que ligó a la columna de Sepharosa CL4B - Ig Gp.
- (vi) Núcleos de células HeLa no parasitadas.
- (vii) Núcleos de células HeLa parasitadas. Fig. 3.10 y Fig. 3.11.

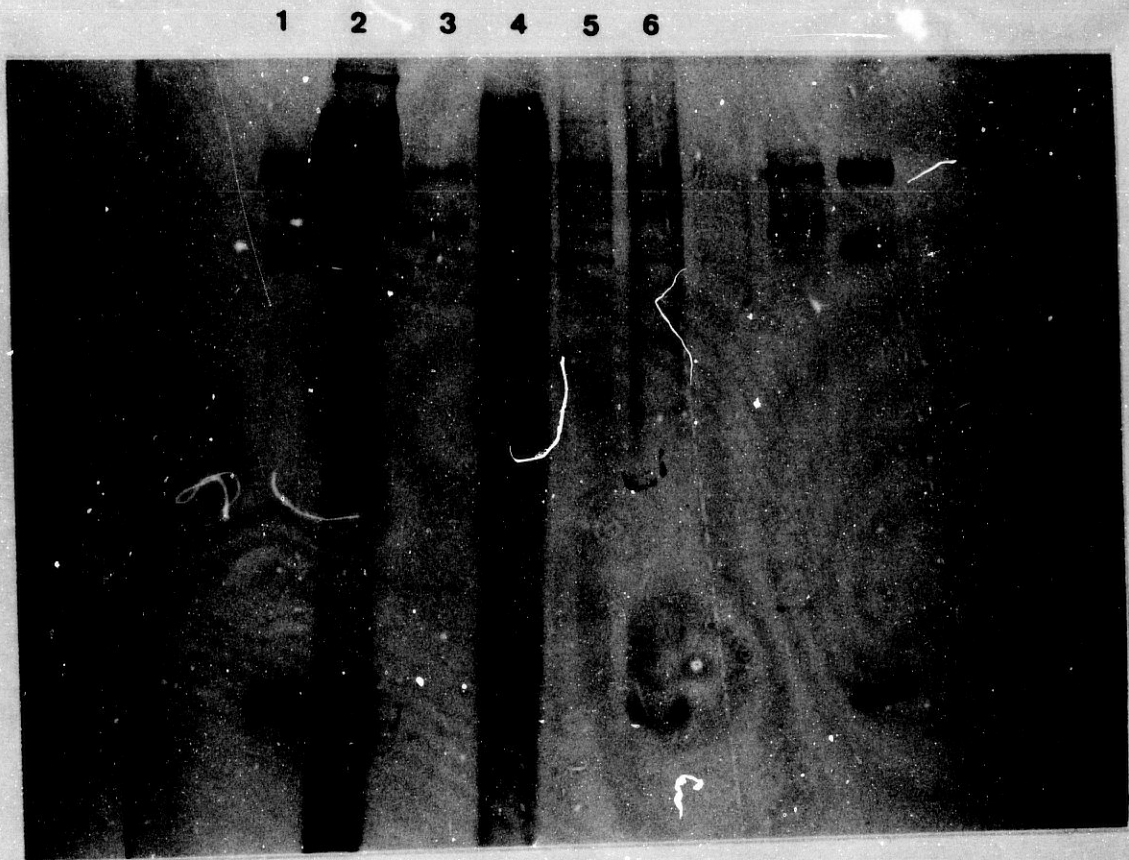


Figura 3.10: *Electroforesis en SDS - Poliacrilamida.*

---

Ma. N. Rodriguez Cabezas

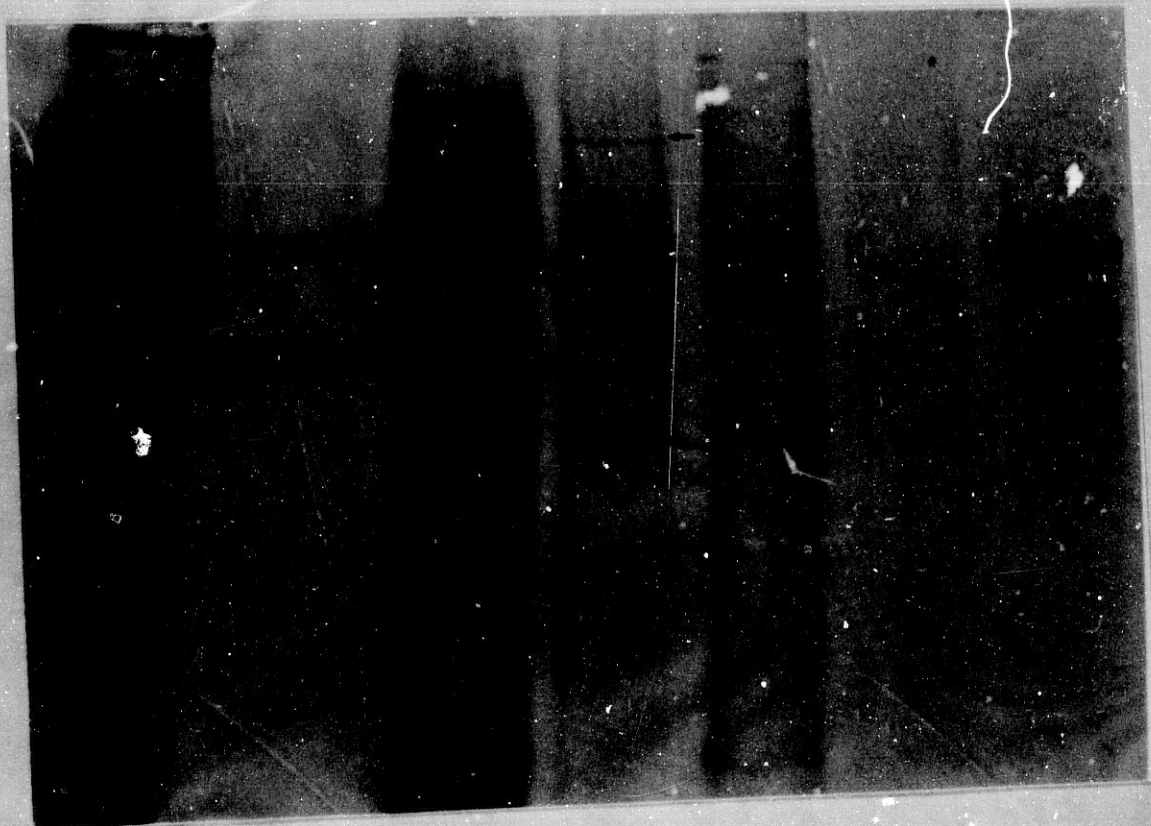


Figura 3.11: *Detalle de la electroforesis.*



Tabla 3.2: Medida de la transcriptasa inversa en núcleos de células no parasitadas y parasitadas.-

MUESTRAS	CPM
Líquido de centelleo	7.5
Núcleos de células no parasitadas	15865
Núcleos de células parasitadas	51403

### 3.7 MEDIDA DE LA TRANSCRIPTASA INVERSA SOBRE LAS DISTINTAS FRACCIONES DE LOS NUCLEOS DE CÉLULAS HeLa NO PARASITADAS Y PARASITADAS POR *T. CRUZI*.

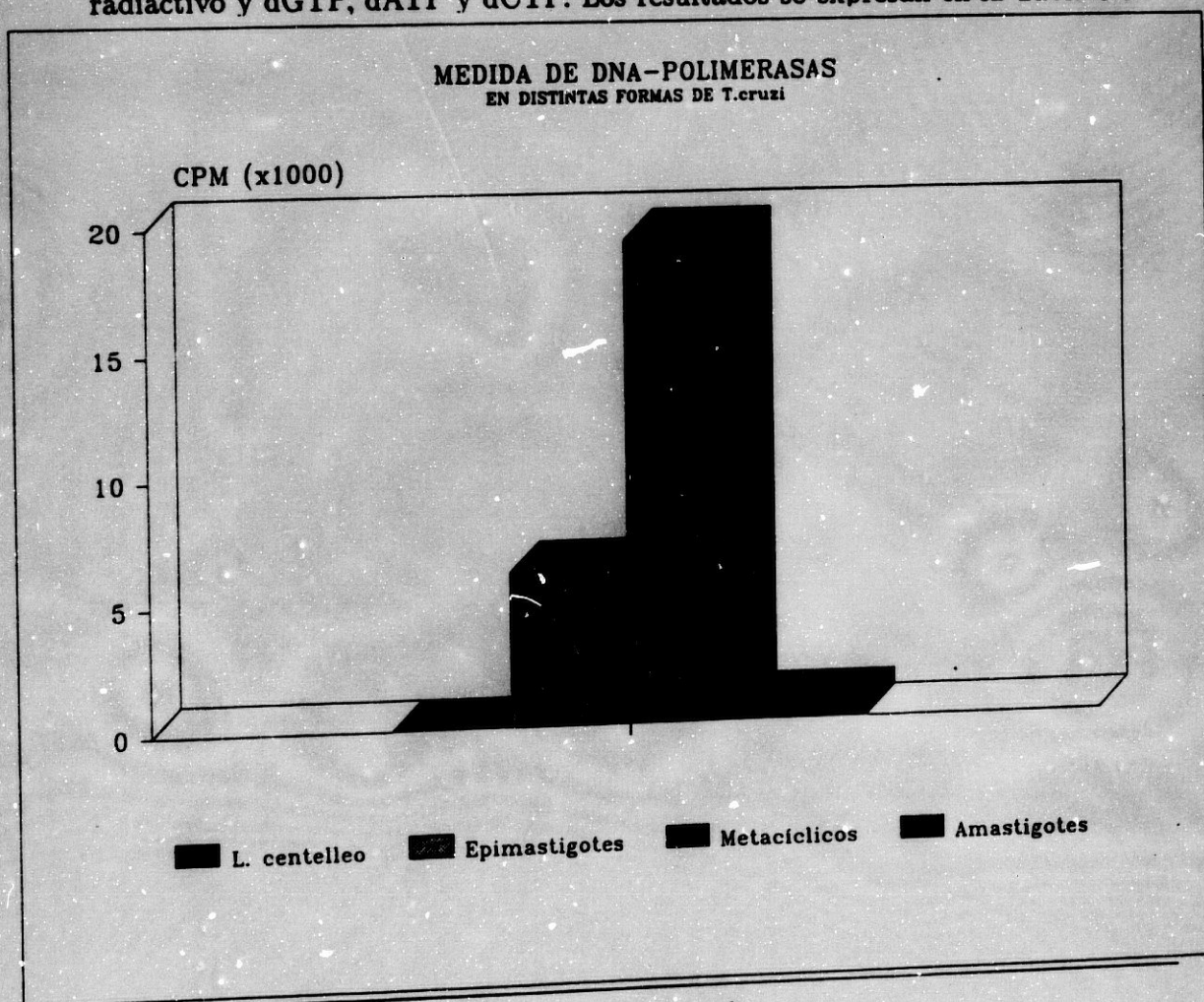
Al objeto de poder estudiar el posible papel enzimático del antígeno de *T. cruzi* retenido en la columna específica, se procedió a estudiar si dicha fracción poseía un papel de retrotranscriptasa. Después de probar diversos métodos, se optó por el método de Schleif y col. 1981. Para ello, se partió de la fracción de núcleos de células HeLa no parasitadas y parasitadas por *T. Cruzi* que quedaban ligadas en la columna de Sepharosa - Ig Gp, Tabla 3.2.

Tabla 3.3: Medida de DNA - polimerasas en *T. cruzi*.

MUESTRAS	CPM
Control líquido de centelleo	6,00
Extracto de epimastigotas	6145,60
Extracto de metacíclicos	19319,85
Extracto de amastigotas	657,45

### 3.8 MEDIDA DE DNA-POLIMERASAS EN EPIMASTIGOTES, METACICLICOS Y AMASTIGOTES DE *T. CRUZI*.

Con extractos de formas metacíclicas, epimastigotas y amastigotas de *T. cruzi*, se realizó una medida de la síntesis que se producía en cada uno de esos estados del ciclo biológico. Como marcador radiactivo se empleó la Timidina tritiada 5' trifosfato tetrasódica (metil- $^3H$ ). Estos extractos se incubaron con este precursor radiactivo y dGTP, dATP y dCTP. Los resultados se expresan en la Tabla 3.3.



### 3.9 CROMATOGRAFIA DE AFINIDAD SOBRE LA COLUMNA DE SEPHAROSA - Ig Gp DE LOS EXTRACTOS DE EPIMASTIGOTES, METACICLICOS Y AMASTIGOTES DE T. CRUZI.

Por la columna de Sepharosa - Ig Gp (Inmunoglobulinas procedentes de un suero frente a núcleos de células HeLa parasitadas por *T. cruzi*), se cromatografiaron los extractos de epimastigotes, metacíclicos y amastigotes de *T. cruzi*, obteniendo una primera fracción que no se ligaba a dichas inmunoglobulinas, y una segunda fracción que se ligaba a dicha columna y que se obtuvo mediante elución con tampón glicina a pH 3; Fig. 3.12.

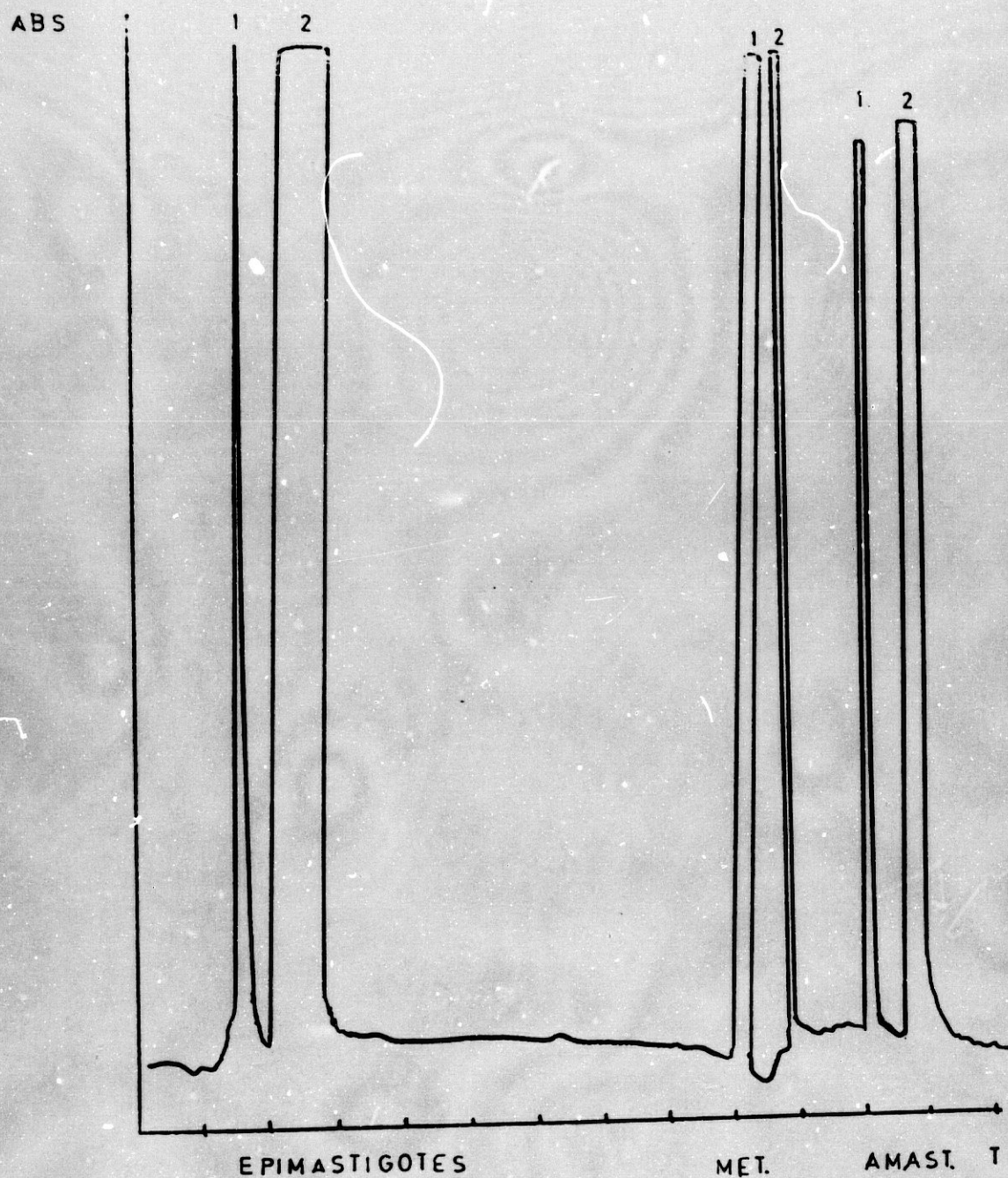


Figura 3.12: Obtención de las fracciones de epimastigotes, metacíclicos y amastigotes a su paso por la columna de Sepharosa - Ig Gp.

Tabla 3.4: Medida de la Transcriptasa inversa en presencia de Suramina sódica y ddCTP.-

MUESTRAS	x CPM
Líquido de centelleo	30.42
Núcleos de células no parasitados	4892.00
Núcleos de células parasitadas	40023.33
Epimastigotes	13875.00
Metacíclicos	14501.70
Amastigotes	14904.20
Núcleos de células no parasitadas más Suramina	3763.00
Núcleos de células parasitadas más Suramina	4596,30
Núcleos de células no parasitadas más ddCTP	1005.53
Núcleos de células parasitadas más ddCTP	2573.60

### 3.10 MEDIDA DE LA TRANSCRIPTASA INVERSA EN PRESENCIA DE LOS INHIBIDORES DE LA MISMA: SURAMINA SODICA Y ddCTP.-

Las concentraciones seleccionadas de los inhibidores (Suramina 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  y ddCTP 50  $\mu\text{M}$ ), se prepararon en agua bidestilada estéril y se añadieron a la muestra problema al inicio de la reacción. Posteriormente se realizó la reacción completa, determinándose por centelleo líquido la radiactividad presente en el material precipitable, tal como se ha descrito en el capítulo correspondiente.

En este caso, los núcleos de células HeLa no parasitadas y parasitadas por *T. cruzi* y los extractos de epimastigotas, metacíclicos y amastigotas de *T. cruzi*, fueron pasados por la columna de Sepharosa - Ig Gp. Las fracciones que quedaron ligadas a dicha columna son las que se emplearon en esta experiencia Tabla 3.4.

### 3.11 TRATAMIENTO IN VITRO DE CELULAS HeLa INFECTADAS CON T. CRUZI CON LOS INHIBIDORES DE LA TRANSCRIPTASA INVERSA: SURAMINA SODICA Y ddCTP.-

Se cultivaron células HeLa en placas de microtitulación de fondo plano donde previamente habíamos introducido cristales borosilicados redondos y estériles. Una vez que los cultivos estuvieron confluentes se infectaron durante 6 horas con formas metacíclicas de *T. cruzi* en medio MEM sin SBF1. Entonces se hicieron 3 bloques de cultivos infectados a los que se les añadieron en distintos tiempos Suramina (100 µg/ml) o ddCTP (50 µM), previamente disueltos en medio MEM sin suero.

#### Tratamiento tipo 1

Cultivos que después de las 6 horas se lavaron y se hicieron 3 lotes:

- (i) Un primer lote se empleó como control de la infección.
- (ii) Un segundo lote se trató durante 2 horas con Suramina (100 µg/ml).
- (iii) Un tercer lote se trató durante 2 horas con ddCTP (50 µM).

Transcurrido este tiempo, los cultivos infectados se lavaron para retirar los productos añadidos y se dejaron en medio MEM con 10% de SBF1 hasta su sacrificio a las 24 (Tabla 3.5), 48 (Tabla 3.6) y 72 horas (Tabla 3.7).

Transcurridos estos tiempos, los cultivos se fijaron con metanol durante 30 segundos y se tiñeron con Giemsa al 10%, procediéndose al recuento al microscopio óptico de al menos 300 células por cristal, calculando el porcentaje de parasitación (% P) y el índice parásito/célula P/C) Tabla 3.5, 3.6 y 3.7. Fig. 3.13 y Fig. 3.14.

Tabla 3.5: % P e P/C a las 24 horas del tratamiento con los inhibidores de la transcriptasa inversa (Tratamiento de 2 horas después de la infección).-

	% P	P/C
Control infección	29+/-1.29	1.57+/-0.013
Tratadas Suramina	29+/-1.35	1.42+/-0.021*
Tratadas ddCTP	34+/-0.81	1.57+/-0.039*

\* no significativo para la t de Student.  
\* \* significativo para la t de Student.

Tabla 3.6: % P e P/C a las 48 horas del tratamiento con los inhibidores de la transcriptasa inversa (Tratamiento de 2 horas después de la infección).-

	% P	P/C
Control infección	34+/-1.54	2.40+/-0.02
Tratadas Suramina	19.4+/-1.1	1.52+/-0.04**
Tratadas ddCTP	26+/-2.16	1.6+/-0.025**

\* no significativo para la t de Student.  
\* \* significativo para la t de Student.

Tabla 3.7: % P e P/C a las 72 horas del tratamiento con los inhibidores de la transcriptasa inversa (Tratamiento de 2 horas después de la infección).-

	%P	P/C
Control infección	16+/-1.63	13.55+/-0.6
Tratadas Suramina	20.6+/-1.91	4.92+/-0.24**
Tratadas ddCTP	19.33+/-1.7	5.38+/-0.32**

\* no significativo para la t de Student.  
\* \* significativo para la t de Student.

**Tratamiento tipo 2.**

Cultivos que después de las 6 horas de infección se lavaron, y se dejaron en medio MEM al 10% de SBF1 durante 15 horas. Transcurrido este tiempo se hicieron 3 lotes:

- (i) Un primer lote control de células infectadas.
- (ii) Un segundo lote se trató durante 2 horas con Suramina.
- (iii) Un tercer lote se trató durante 2 horas con ddCTP.

Transcurrido este tiempo, los cultivos infectados se lavaron para retirar los productos añadidos y se dejaron en medio MEM al 10 % de SBF1 hasta su sacrificio a las 24 (Tabla 3.8), 48 (Tabla 3.9) y 72 horas (Tabla 3.10).

Pasados estos tiempos, los cultivos se fijaron con metanol durante 30 segundos y se tiñeron con Giemsa al 10 %, procediéndose al recuento al microscopio óptico de al menos 300 células por cristal, calculando el porcentaje de parasitación (%P) y el índice parásito/célula (P/C) a las 24 horas (Tabla 3.8); 48 horas (Tabla 3.9); y 72 horas (Tabla 3.10); Fig. 3.15. y Fig. 3.16.





Figura 3.13: Tratamiento de cultivos de células HeLa infectados por *T. cruzi*. Tras la infección los cultivos se trataron durante 2 horas con Suramina (a), dd-CTP (b). Se sacrificaron a las 24, 48 y 72 horas del tratamiento.

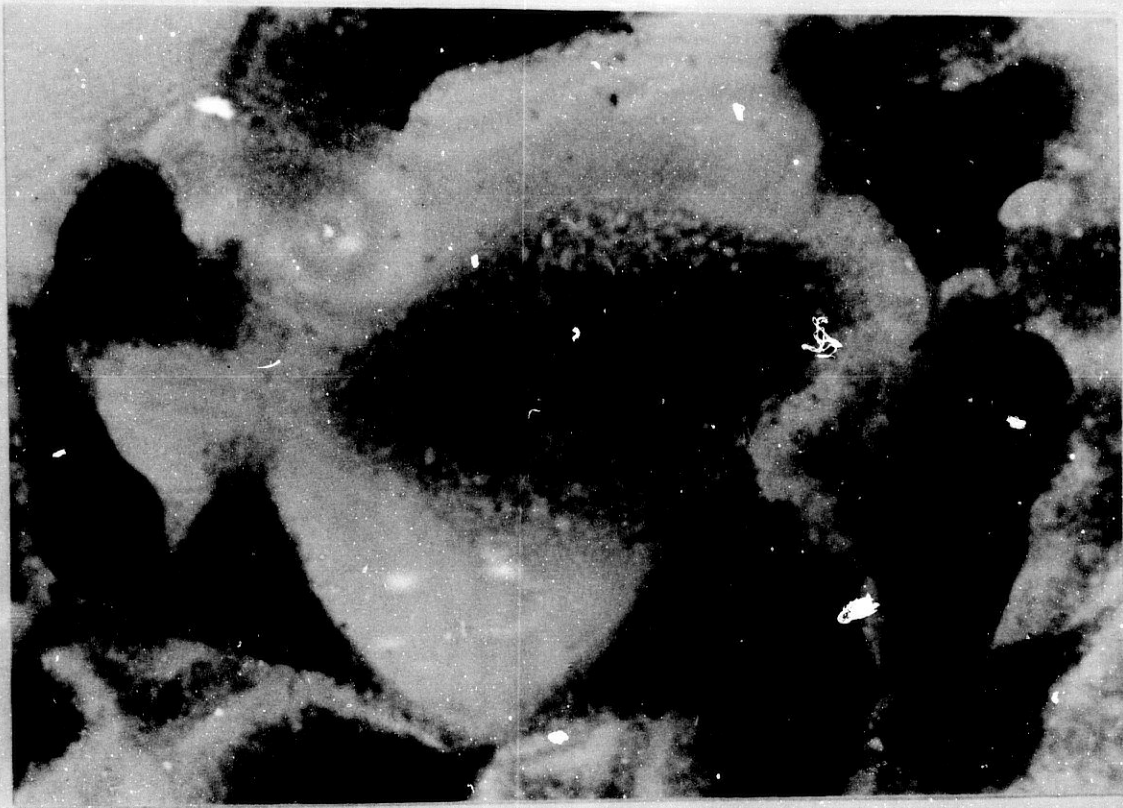


Figura 3.14: *Tratamiento de cultivos de células HeLa infectados por T. cruzi. Tras la infección, un cultivo se dejó como control (c). Se sacrificaron a las 24, 48 y 72 horas del tratamiento.*

Tabla 3.8: % P e P/C a las 24 horas del tratamiento con los inhibidores de la transcriptasa inversa (Tratamiento de 2 horas a las 15 horas de la infección).-

	%P	P/C
Control infección	28+/-3.59	1.58+/-0.10
Tratadas Suramina	24+/-1.82	1.40+/-0.07*
Tratadas ddCTP	29+/-3.16	1.45+/-0.09*

\* no significativo para la t de Student.  
\* \* significativo para la t de Student.

Tabla 3.9: %P e P/C a las 48 horas del tratamiento con los inhibidores de la transcriptasa inversa (Tratamiento de 2 horas a las 15 horas de la infección).-

	%P	P/C
Control infección	26.0+/-2.08	6.68+/-0.49
Tratadas Suramina	20.5+/-2.50	5.50+/-0.42*
Tratadas ddCTP	24.5+/-2.21	5.65+/-0.23*

\* no significativo para la t de Student.  
\* \* significativo para la t de Student.

Tabla 3.10: %P e P/C a las 72 horas del tratamiento con los inhibidores de la transcriptasa inversa (Tratamiento de 2 horas a las 15 horas de la infección).-

	%P	P/C
Control infección	18+/-1.82	15.50+/-1.5
Tratadas Suramina	17+/-1.29	17.70+/-0.96*
Tratadas ddCTP	17+/-2.38	15.02+/-0.48*

\* no significativo para la t de Student.  
\* \* significativo para la t de Student.

**Tratamiento tipo 3.**

Cultivos que tras 6 horas de infección, se lavaron y se hicieron 3 lotes:

- (i) Un primer lote control de infección.
- (ii) Un segundo lote se trató durante 15 horas con Suramina.
- (iii) Un tercer lote se trató durante 15 horas con ddCTP.

Transcurrido ese tiempo, los cultivos infectados se lavaron para quitar los restos de los productos y se sacrificaron a las 24 (Tabla 3.11), 48 (Tabla 3.12) y 72 horas (Tabla 3.13) del tratamiento. Estos cultivos, se fijaron con metanol durante 30 segundos y se tiñeron con Giemsa al 10%, procediéndose al recuento al microscopio óptico de al menos 300 células por cristal, calculando el porcentaje de parasitación (% P) y el índice parásito/célula (P/C) Tablas 3.11, 3.12, 3.13; Fig. 3.17 y Fig. 3.18.

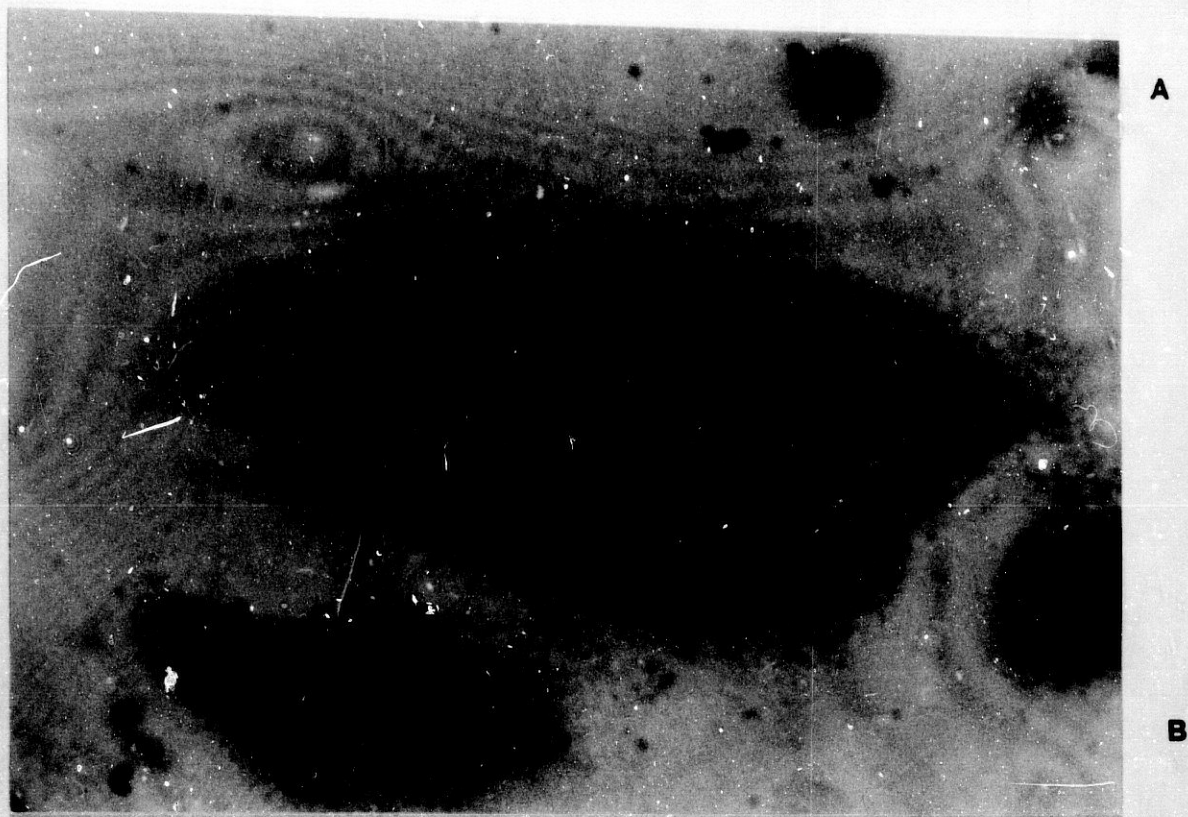


Figura 3.15: Cultivos de células HeLa infectadas por *T. cruzi*. A las 15 horas de la infección los cultivos se trataron durante 2 horas con Suramina (a), ddCTP (b), dejando un grupo como control de la infección (c). Estos cultivos se sacrificaron a las 24, 48 y 72 horas.

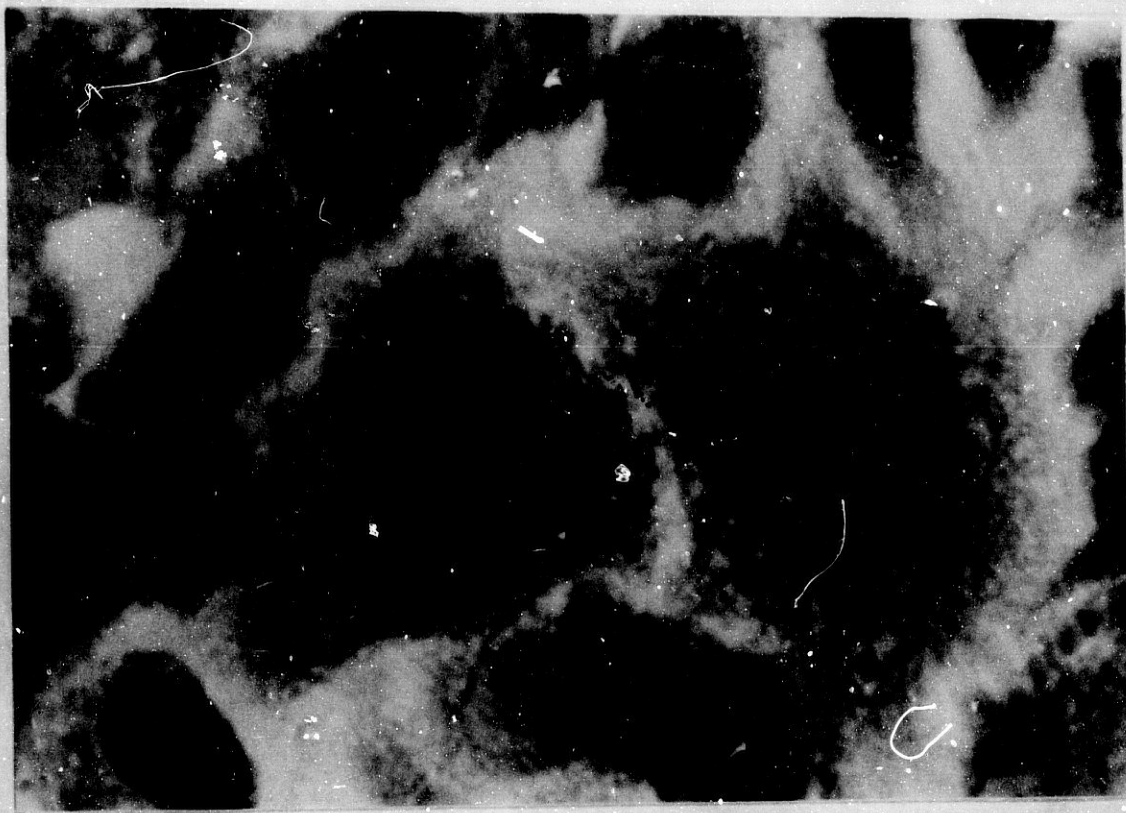


Figura 3.16: Cultivos de células HeLa infectadas por *T. cruzi*. A las 15 horas de la infección los cultivos se trataron durante 2 horas con Suraminá (a), ddCTP (b), dejando un grupo como control de la infección (c). Estos cultivos se sacrificaron a las 24, 48 y 72 horas.

Tabla 3.11: % P e P/C a las 24 horas del tratamiento con los inhibidores de la transcriptasa inversa de 15 horas.-

	%P	P/C
Control infección	26.75+/-1.1	1.35+/-0.04
Tratadas Suramina	26.00+/-0.4	1.16+/-0.014+
Tratadas ddCTP	22.75+/-1.7	1.30+/-0.017*

+ marginalmente significativo para la t de Student.  
 \* no significativo para la t de Student.  
 \* \* significativo para la t de Student.

Tabla 3.12: %P e P/C a las 48 horas del tratamiento con los inhibidores de la transcriptasa inversa de 15 horas.-

	%P	P/C
Control infección	24.7+/-0.47	5.23+/-0.38
Tratadas Suramina	21.3+/-2.86	1.76+/-0.23**
Tratadas ddCTP	23.3+/-1.70	2.86+/-0.15**

\* no significativo para la t de Student.  
 \* \* significativo para la t de Student.

Tabla 3.13: %P e P/C a las 72 horas del tratamiento con los inhibidores de la transcriptasa inversa de 15 horas.-

	%P	P/C
Control infección	11.3+/-1.24	22.32+/-2.4
Tratadas Suramina	22.7+/-2.3	7.00+/-0.5**
Tratadas ddCTP	18.0+/-0.8	6.73+/-0.8**

\* no significativo para la t de Student.  
 \* \* significativo para la t de Student.

Tabla 3.14: Obtención de cDNA.-

MUESTRAS	CPM
<i>Líquido de centelleo</i>	<i>36,01</i>
Núcleos de células no parasitadas	28132.50
Núcleos de células parasitadas	47968.00

### 3.12 OBTENCIÓN DE cDNA.-

Se siguió el método de Schleif y col. (1981) adaptado a nuestros objetivos. A las 3 horas de reacción se tomaron unas alícuotas de las muestras con el fin de poder seguir la reacción. Una vez finalizada ésta, el cDNA obtenido se lavó con etanol a -20 °C y el botón obtenido se disolvió en TE, dejándolo almacenado a -20 °C  
Tabla 3.14.



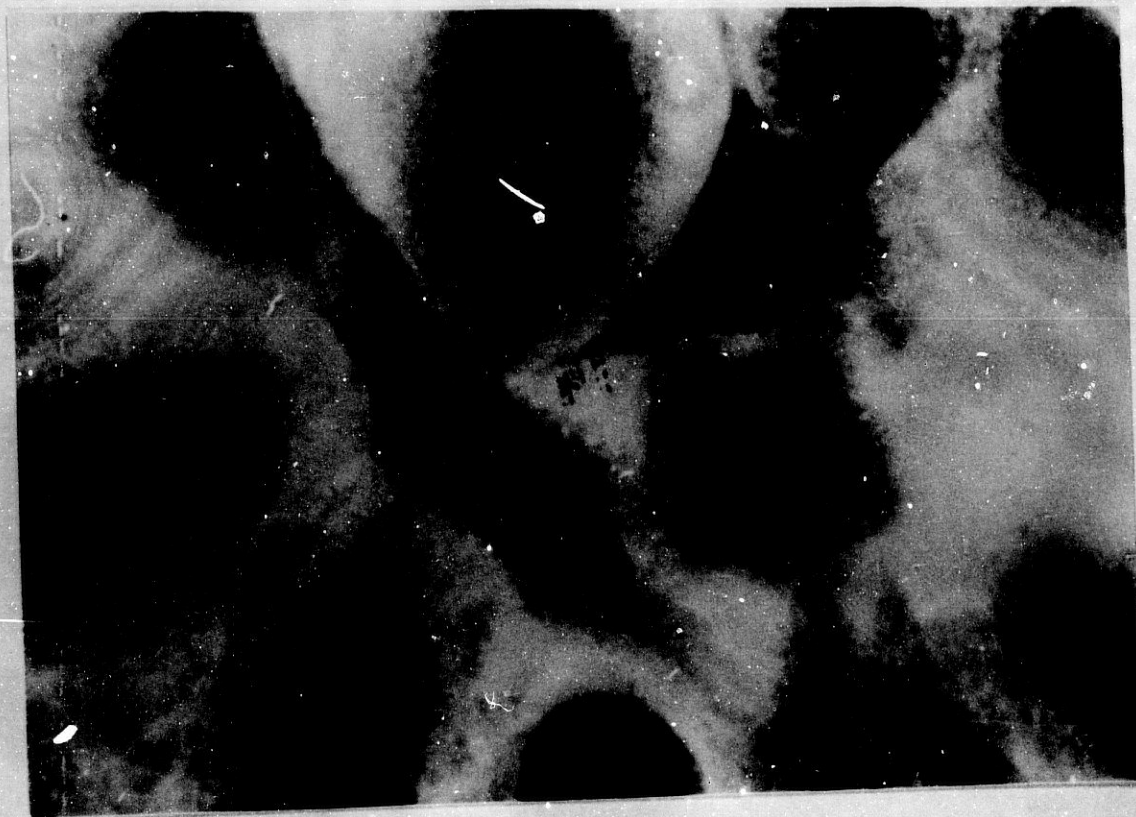
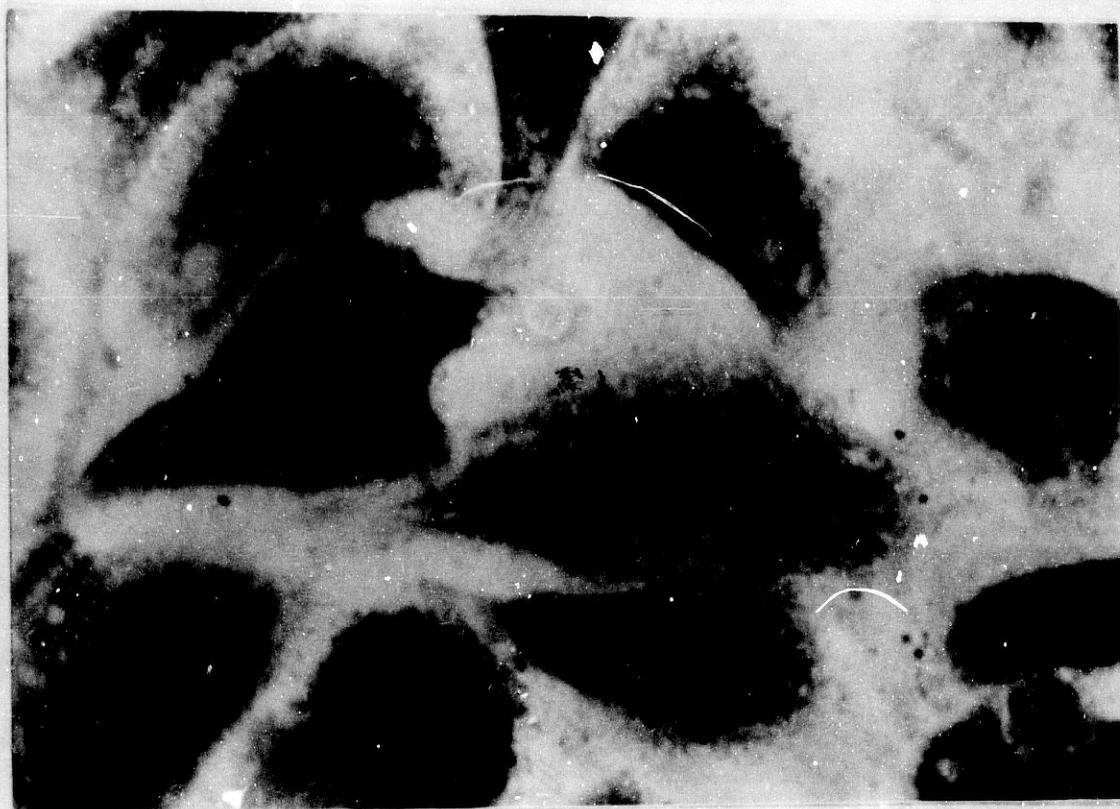


Figura 3.17: Cultivos de células HeLa infectadas por *T. cruzi*. Se trataron durante 15 horas con Suramina (a). Estas células se sacrificaron a las 24, 48 y 72 horas del tratamiento.



B

Figura 3.18: Cultivos de células HeLa infectadas por *T. cruzi*. Se trataron durante 15 horas con ddCTP (b), dejando un lote como control de la infección. Estas células se sacrificaron a las 24, 48 y 72 horas del tratamiento.

### 3.13 ELECTROFORESIS DE AGAROSA PARA LA DETECCION DEL cDNA.-

Se procedió al desarrollo en gel de agarosa al 1% de los cDNA obtenidos partiendo de núcleos de células HeLa no parasitadas y parasitadas por *T. cruzi*.

Esta electroforesis se realizó en un gel de agarosa (LKB) al 1% en medio TAE, con unas condiciones de corrido de 4 horas a 50 V, mediante una fuente de alimentación LKB 2303 Multidrive XL. Fig. 3.19.

En esta electroforesis no pudimos visulizar el supuesto cDNA obtenido, pero sí pudimos poner de manifiesto la no existencia de RNA en las muestras problema.

Las muestras fueron:

- (i) Control Peso Molecular: DNA de pBR328 (100  $\mu$  g/ml). Este pBR328 había sido previamente digerido separadamente con Bam HI, Bgl 1 y Hinf 1, y mezclados en una proporción 2:3:3. Aparecen 16 fragmentos de: 4907, 2176, 1766, 1230, 1033, 653, 517, 453, 394, 298( $\times$ 2), 234( $\times$ 2), 220 y 154( $\times$ 2) pares de bases.
- (ii) Control de RNA. El RNA empleado en las pruebas de transcriptasa inversa y síntesis de cDNA.
- (iii) cDNA de núcleos de células no parasitadas.
- (iv) cDNA de núcleos de células parasitadas.
- (v) Control de Peso Molecular. Fago lambda cortado con HindIII. Aparecen 7 fragmentos de 23,1, 9,4, 6,6, 4, 2,3, 2 y 0,6 Kb.

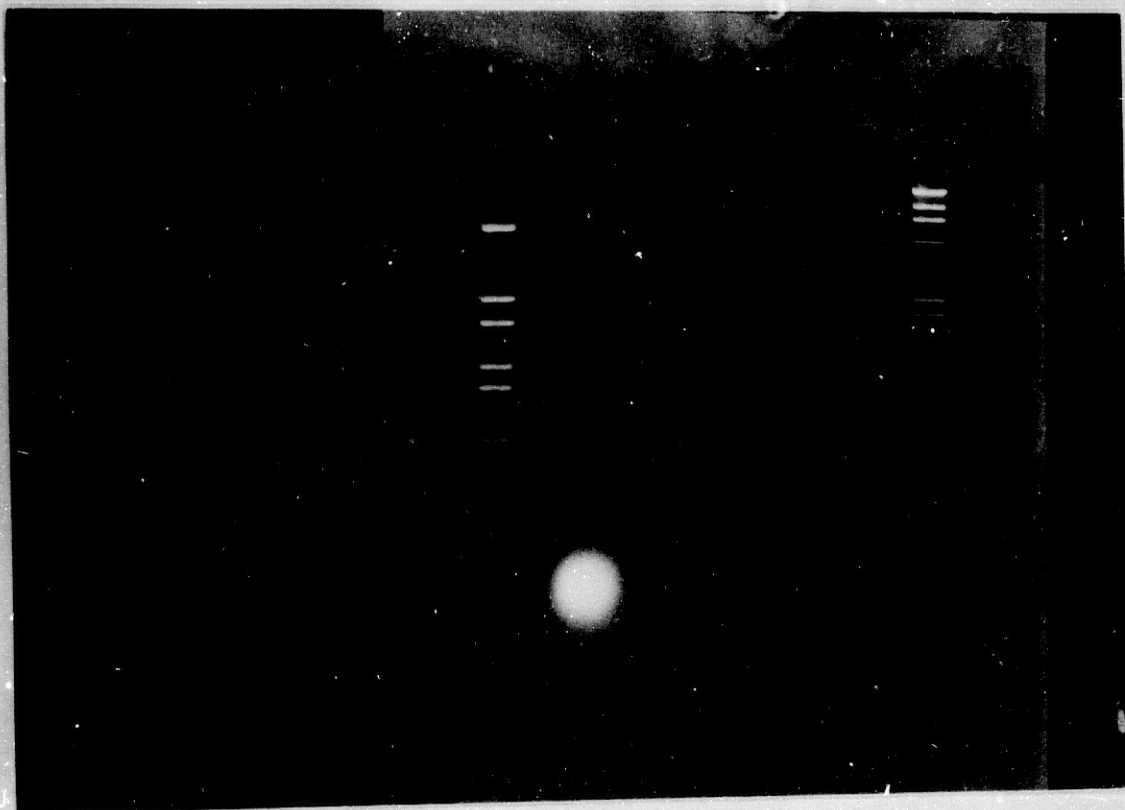


Figura 3.19: *Electroforesis de Agarosa al 1%.*

### 3.14 MARCAJE DE cDNA DE FORMA NO RADIATIVA.-

Hemos empleado el kit de marcaje no radiactivo de los Laboratorios Boheringer-Manheim. La cantidad de cDNA se determinó mediante detección inmunológica con una reacción de color.

Sobre una membrana de nylon (Hybond-N de 0,45  $\mu\text{m}$ ) se pusieron las siguientes muestras, (Fig. 3.20.):

- (i) Control de concentración de DNA marcado. Forma parte del kit y consiste en DNA de pBR328 linearizado y marcado siguiendo el protocolo de dicho kit. Tiene una concentración de 0.4  $\mu\text{g} / \mu\text{l}$ . Se preparó a las diluciones de:

1/10: 0.04  $\mu\text{g} / \mu\text{l}$

1/100:  $4 \times 10^{-3}$   $\mu\text{g} / \mu\text{l}$  (4 ng/  $\mu\text{l}$ )

1/1000:  $4 \times 10^{-4}$   $\mu\text{g} / \mu\text{l}$  (0.4 ng/  $\mu\text{l}$ )

1/10000:  $4 \times 10^{-5}$   $\mu\text{g} / \mu\text{l}$  (0.04 ng/  $\mu\text{l}$ )

1/100000:  $4 \times 10^{-6}$   $\mu\text{g} / \mu\text{l}$  (4 pg/  $\mu\text{l}$ )

- (ii) Control de la reacción de marcaje. Consiste en DNA de pBR328 linearizado con Eco RI. Este DNA de concentración conocida (1  $\mu\text{g} / 5 \mu\text{l}$ ), se marca a la vez que las muestras problema, y de esta manera podemos observar la eficiencia de esta reacción. Al final del marcaje el DNA obtenido por precipitación, se resuspende en 50  $\mu\text{l}$  de TE por lo que obtenemos una concentración final de 1  $\mu\text{g} / 50 \mu\text{l}$  (0.02  $\mu\text{g} / \mu\text{l}$ ).

- (iii) cDNA procedente de la incubación como transcriptasa inversa de la fracción de núcleos de células HeLa no parasitadas que se ligó a la columna de Sepharosa - Ig Gp (cDNA noP).

- (iv) cDNA procedente de la incubación como transcriptasa inversa de la fracción de núcleos de células HeLa parasitadas por *T. cruzi* que se ligó a la columna de Sepharosa - Ig Gp (cDNA P).

(v) Medio TE.

El DNA se fijó a la membrana mediante transiluminación a la luz ultravioleta durante 3 minutos, y se detectó la concentración por una reacción de color. Las concentraciones obtenidas fueron:

cDNA noP < 4pg/ $\mu$ l.

0.4 ng/ $\mu$ l > cDNA P > 0.04 ng/ $\mu$ l.

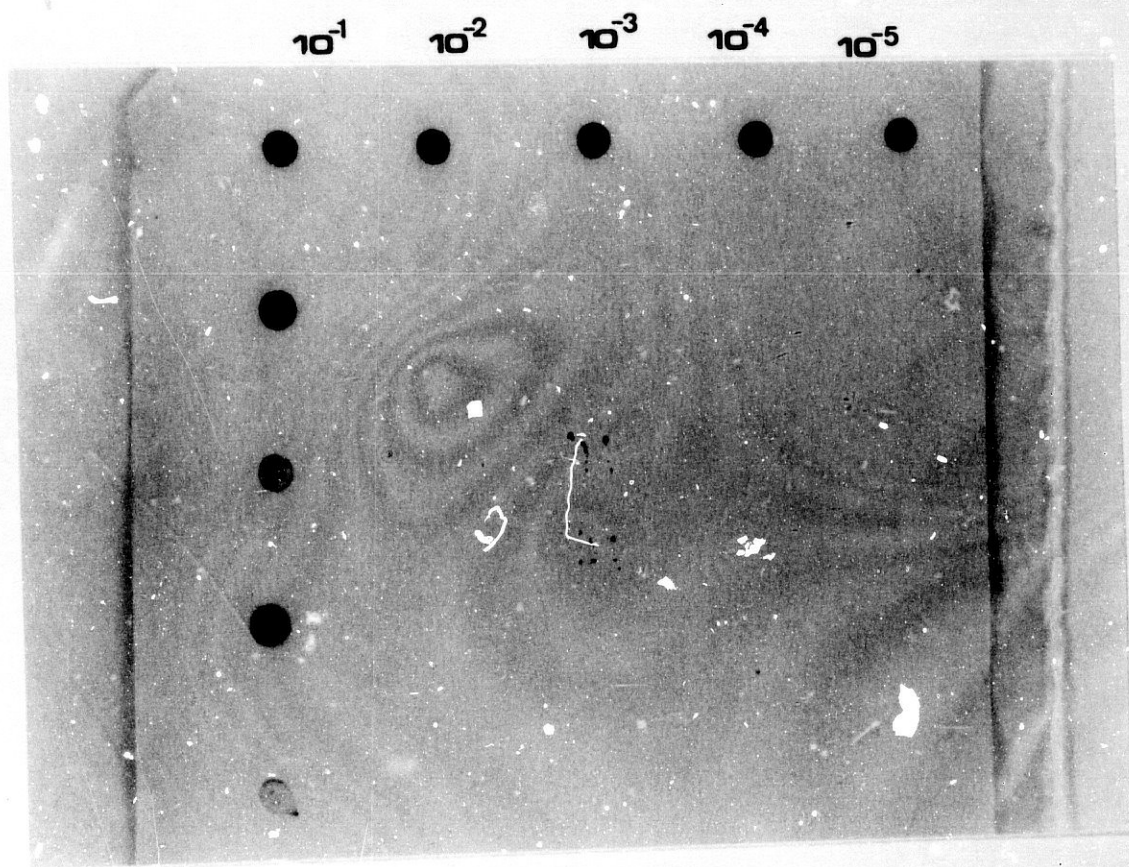


Figura 3.20: *Detección inmunológica del cDNA marcado no radiactivamente.*

### 3.15 PRESENCIA DE VIRUS EN *T. CRUZI*.

Tras la centrifugación en gradiente de Cloruro de Cesio de un lisado de formas epimastigotas de *T. cruzi*, se procedió a la realización de una tinción negativa para microscopía electrónica de las fracciones que poseían mayor absorbancia a 260 nm (Fig.3.21.).





Figura 3.21: *Presencia de virus en T. cruzi.*

### 3.16 DETECCION INMUNOLOGICA DEL VIRUS CON UN SUERO FRENTE A T. CRUZI.-

La fracción obtenida mediante gradiente de cloruro de cesio, de formas epimastigotas de *T. cruzi*, fué puesta en contacto con cultivos de células HeLa, en medio MEM, durante 24, 48 y 72 horas. Transcurridos estos tiempos, se fijaron con acetona y se procesaron para una inmunofluorescencia indirecta, frente a un suero anti *Trypanosoma cruzi*.

Este suero, previamente, había sido adsorbido sobre una capa de células HeLa fijadas con acetona.

Observamos que dicho suero producía fluorescencia hasta una dilución del mismo de 1/200. También observamos la presencia de efectos citopatológicos en dichas células, frente a un control de células HeLa no tratadas Fig. 3.22 y Fig. 3.23.



Figura 3.22: *Detección inmunológica del virus con un suero frente a T. cruzi en células no tratadas.*

---

Ma. N. Rodriguez Cabezas



Figura 3.23: *Detección inmunológica del virus con un suero frente a T. cruzi en células tratadas durante 24, 48 y 72 horas.*

Tabla 3.15: Medida de la transcriptasa inversa en la fracción de mayor absorbancia a 260 nm procedente de la centrifugación en cloruro de cesio de un sonocado de formas epimastigotas de *T. cruzi*.

MUESTRAS	CPM
Control líquido de centelleo	59.00
Blanco control	14402.22
Fracción de virus	33416.66

### 3.17 MEDIDA DE LA TRANSCRIPTASA INVERSA EN LA FRACCIÓN OBTENIDA POR ULTRACENTRIFUGACION.-

Con la fracción de gradiente de cloruro de cesio, de un sonocado de formas epimastigotas de *T. cruzi*, que poseía mayor absorbancia a 260 nm, y en la cual pusimos de manifiesto la presencia de partículas semejantes a virus mediante tinción negativa para microscopía electrónica, realizamos una prueba de transcriptasa inversa, con TTP-  $^3H$  como marcador radiactivo, y posterior precipitación con ácido tricloracético. Los resultados obtenidos se reflejan en la TABLA 3.15.

---

**DISCUSSION.-**

---

---

*Trypanosoma cruzi* es el único *Trypanosoma* de los que afectan al hombre, que presenta un ciclo obligado de multiplicación intracelular en las células del hospedador vertebrado.

Junto con este *Trypanosoma*, existen otros con un ciclo similar intracelular, aparentemente apatógenos para el hombre, como *Trypanosoma dionisii*, parásito de murciélagos, también del área americana.

Dentro de la patología de la Enfermedad de Chagas, como quedó indicado anteriormente, se encuentran una serie de manifestaciones degenerativas, producidas por la entrada y destrucción de los parásitos en el interior de las células, y otras, como degeneraciones nerviosas, denervación del aparato digestivo y corazón, que son imputadas actualmente a autoanticuerpos o a toxinas liberadas por el propio parásito.

Sin embargo, la diferente patología que muestran algunos individuos, en los que las manifestaciones cardíacas o intestinales son inexistentes o prácticamente nulas, es atribuido a diferencias entre las diferentes cepas del parásito o al estado inmunológico del huésped.

La fase patológica de la enfermedad se inicia con una parasitemia elevada, que se corresponde con una fase inicial de inmunodepresión. Transcurrido un tiempo, los parásitos desaparecen del torrente circulatorio, pasando a la fase crónica de la enfermedad, donde tienen lugar todas las manifestaciones patológicas.

Desde 1908, año en que se iniciaron los primeros cultivos in vitro, se pudo comprobar que el parásito inducía en su célula hospedadora una serie de cambios y alteraciones, producidas o inducidas por su propia parasitación.

De esta manera, se comprobó que había alteraciones en la capacidad de multiplicación de la célula, es decir, variaciones en la cariocinesis y citocinesis de la misma, así como variaciones en la metafase y formación del huso acromático (Dvorak y Hyde, 1973).

Warren en 1958, encuentra variaciones en los niveles respiratorios de las células parasitadas. En 1965, Leikika, de igual manera, encuentra alteraciones a nivel de algunas enzimas, como citocromooxidasa, difosforasa, cambio en el metabolismo proteico y de los ácidos nucleicos de la célula parasitada, estudiando que estos cambios inducían modificaciones de la multiplicación celular, provocando una inhibición de la mitosis de líneas celulares tumorales.

Danilova y Kalunikova en 1968, atribuyeron estos cambios a la existencia de un posible "antibiótico" denominado por ellos como "cruzina", presente en los

extractos de los formas promastigotes del parásito en cultivo.

En 1975, Bhattacharya y Janovy, trabajando con cultivos de *Leishmania*, en un excelente trabajo, encuentran un intercambio de macromoléculas entre las formas amastigotas del parásito y el núcleo de las células parasitadas.

En dicho trabajo, empleando técnicas autorradiográficas, llegan a la conclusión de que el material de intercambio son RNA - proteínas, y que dicho intercambio, ocurre bidireccionalmente.

En el año 1984, Jimenez - Ortiz y col., estudian las variaciones en el contenido de ácidos nucleicos en el núcleo de las células parasitadas por *T. cruzi*.

Observan como dicho aumento se debe a un mayor contenido de DNA, que corresponde a las fases iniciales del ciclo intracelular, y no se ve acompañado por una mayor incorporación de Uridina radiactiva, ni de RNA nuclear, lo cual parece indicar que dicho aumento de DNA no se ve acompañado por una mayor transcripción ni traducción.

Este mismo autor, en 1981, en una tesis doctoral de la Universidad de Granada, encuentra así mismo, mediante técnicas autorradiográficas, la existencia de un intercambio macromolecular a nivel también de RNA - proteínas, entre el parásito y el núcleo celular.

Dicho intercambio se mantiene, aún cuando las células han sido tratadas con altas concentraciones de Actinomicina D, como son 200  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , lo cual parece indicar que, dicho intercambio no es un mecanismo de reutilización de componentes nucleicos por parte de la célula, y que para dicho intercambio, existe una colaboración activa por parte del parásito.

La existencia de antígenos parasitarios en la membrana de la célula huésped se conoce desde hace años.

Así, en *Plasmodium vivax*, en 1970, Brown y col., encuentran antígenos parasitarios sobre la membrana de los glóbulos rojos parasitados, confirmándose posteriormente dichos antígenos en otras especies de *Plasmodium*, como ocurre en *Plasmodium falciparum*.

La validez de que alguno de estos antígenos, sean antígenos excretados - segregados por el parásito, o sean modificaciones estructurales de algunas proteínas intrínsecas de la célula inducidas por el parásito, y como consecuencia antigénicas para el sistema inmunológico que las reconoce como extrañas y no propias, ha sido postulado recientemente.



Así, algunos de los antígenos considerados hasta hace muy poco tiempo, como propios de *P. falciparum* (que aparecen en las ondulaciones de membrana de los eritrocitos parasitados), cuando se han purificado dichos "antígenos", se ha podido comprobar que los anticuerpos dirigidos frente a ellos, reconocen proteínas de la cara interna de la membrana de los eritrocitos.

Baker y col., en 1977, encontraron antígenos parasitarios en la membrana de macrófagos parasitados por *Trypanosoma dionisii*, y en macrófagos infectados por *Leishmania donovani* (Farah y col., 1975).

La existencia de antígenos del agente infeccioso en la membrana de la célula huésped, no se ha encontrado exclusivamente en protozoos intracelulares.

En algunos sistemas virales (Zinkernagel y col., 1974) o bacterianos (Zinkernagel y col., 1977), la presencia de estos antígenos da lugar a reacciones autoinmunes, contribuyendo a aumentar la patología de los mismos.

En el caso específico de la infección por *T. cruzi*, Margarino y col., en 1929, ya observaron la intensa destrucción e células de miocardio, que no se correspondían con la existencia de parásitos en las mismas.

Ribeiro dos Santos y col., en 1977, detectaron antígenos de *T. cruzi*, en la superficie de neuronas cardíacas que no se encontraban parasitadas por el protozoo.

Ribeiro dos Santos y Hudson, en 1980, en estudios realizados in vitro sobre células de músculo y neuronas, comprueban la aparición masiva de antígenos de *T. cruzi*, no sólo en las células parasitadas, sino también en las células no parasitadas a partir de las 72 horas de cultivo, observación comprobada por Abrahamson y Kloetzel sobre células LLC-MK, en 1980.

Ortega-Torres (1983), empleando técnicas inmunológicas, detectó antígenos del parásito en los primeros momentos de la infección sobre la membrana celular, inicialmente presentes en las células parasitadas y transcurridas 48 horas de cultivo, en la membrana de las células no parasitadas.

De igual manera, esta autora encontró que, a partir de las 9 horas de cultivo existen antígenos de *T. cruzi* en membrana y citoplasma de las células parasitadas, y que tras 24 horas de cultivo hasta el final del mismo (72 horas), tanto por Inmunofluorescencia indirecta (IFI), como por la técnica inmunoquímica peroxidasa - antiperoxidasa, dichos antígenos aparecen mayoritarios en el núcleo y nucleolo de las células parasitadas.

Dicha observación corresponde con las llevadas a cabo por Jimenez-Ortiz (1980), la cual observa como el flujo de marcas radiactivas de RNA - proteínas se dirige desde el amastigote intracelular a partir de las 7 horas postparasitación, interrumpiéndose el mismo hacia las 19 horas, mientras que los nucleolos de las células parasitadas muestran el máximo marcaje entre las 10 y 22 horas postparasitación.

Tras este momento, los parásitos aparecen totalmente desmarcados, aún cuando, como se decía anteriormente, se empleaba Actinomicina D en el pretratamiento de las células.

Castanys (1987), haciendo una electroforesis y posterior fluorografía de núcleos de células que habían sido previamente parasitadas por formas metacíclicas de *T. cruzi* marcadas intensamente con metionina radiactiva, encuentra tres proteínas fuertemente marcadas, que unicamente pueden corresponder a proteínas del parásito, de pesos moleculares de 53, 47 y 43 Kd.

Este mismo autor, en su Tesis Doctoral, extrae núcleos de células parasitadas, procurando eliminar las formas amastigotas del parásito, y los hibrida con células HeLa no infectadas, encontrando que hasta los 15 días posteriores a la hibridación, las células híbridas resultantes expresaban antígenos *antiT. cruzi*.

En una serie de estudios inmunológicos llevados a cabo por De Lucca y col.(1981), encontraron que el mRNA extraído de bazos de ratones infectados por *T. cruzi*, era capaz de activar macrófagos frente a *T. cruzi*.

La actividad del mRNA se eliminó mediante el tratamiento con RNasa pancreática. Así ven, que el Poly(A) contenido en este RNA fué la única fracción activa en la hipersensibilidad retardada transferida a ratones que poseían un Chagas experimental.

En 1982, los mismos autores estudian la actividad del RNA polisomal aislado de bazos de ratas infectadas por *T. cruzi*. Este RNA transfería reactividad de antígenos de *T. cruzi* a linfocitos humanos no sensibilizados de sangre periférica, confiriéndole una hipersensibilidad retardada y una protección significativa frente a la infección por *T. cruzi*.

En 1986, continuando con el mismo tipo de trabajos, encuentran un péptido dializable aislado de ratones infectados TFi, capaz de transferir inmunidad frente a *T. cruzi* en ratones normales.

Ellos emiten la hipótesis de que el TFi es un derivado directo del RNA obtenido de bazo de animales parasitados con capacidad inmune.

En base a los datos obtenidos por los miembros de nuestro equipo, y a otros que se han reflejado brevemente en esta discusión, decidimos abordar el estudio del material "intercambiable" de *T. cruzi* presente en el núcleo de las células parasitadas.

Para ello, y como se ha reflejado en Material y Métodos, procedimos al aislamiento e inmunización de ratones con núcleos procedentes de células parasitadas, sacrificadas a las 15 horas de parasitación, tiempo en que trabajos anteriores, tanto autorradiográficos como inmunológicos, habían revelado la presencia de antígenos del parásito integrados en el núcleo de la célula hospedadora.

Estudios inmunológicos realizados por algunos autores habían revelado la presencia de "autoanticuerpos" frente a RNA - proteínas nucleares.

Los sueros obtenidos tras la inmunización fueron adsorbidos frente a células no parasitadas fijadas con acetona y titulados.

La posterior purificación de Ig G y su unión a Sepharosa nos permitió mediante cromatografía de afinidad, purificar el antígeno presente en el núcleo de la célula.

La electroforesis de las fracciones cromatografiadas (procedentes de núcleos de células parasitadas y no parasitadas), reveló la existencia de una serie de bandas presentes en los núcleos de células parasitadas, que no existían en el núcleo de las células no parasitadas, y que aparecían en la fracción purificada.

La existencia de un antígeno del parásito en el núcleo de una célula parasitada, como hemos visto anteriormente, había sido demostrado por otros miembros de nuestro equipo, y constituye un hecho biológico no extraño en otros sistemas biológicos.

Así, como ejemplo, el Antígeno T del virus SV40 es inmunológicamente detectable en el núcleo de las células parasitadas (Reer y col., 1975; Tjian, 1978).

La presencia de un antígeno parasitario en el núcleo de la célula puede, a nuestro entender, indicar la existencia de un complejo biológico en el que el parásito necesite desreprimir, inducir o transformar la maquinaria biosintética de la célula en su propio beneficio.

En el presente trabajo hemos pretendido contestar algunas de estas cuestiones, para más adelante poder explicar las modificaciones que a nivel molecular conlleva la parasitación por *T. cruzi*.

Para poder explicar la existencia de este antígeno de *T. cruzi*, procedimos a estudiar si mostraba actividad de Retro transcriptasa.

Para ello, seguimos la metodología de Schleif y col. (1981), con la posterior precipitación con ácido tricloroacético y medida de la radiactividad sobre filtros GFC (Whatman) en líquido de centelleo del posible DNA, tanto con la fracción procedente de núcleos de células HeLa no parasitadas, como con la fracción obtenida de las células parasitadas por *T. cruzi*, tal como se muestra en la Fig. 4.1.

Pudimos observar la mayor incorporación radiactiva en la fracción procedente de núcleos de células HeLa parasitadas por *T. cruzi*, frente a la procedente de núcleos de células HeLa no parasitadas.

Cuando la cromatografía de afinidad se realizó con un extracto de las formas del parásito (epimastigotas, metacíclicas y amastigotas), en las tres formas morfológicas se observa una incorporación similar, lo que nos hace pensar que "lo que buscamos" se encuentra en las tres formas del parásito, tal como podemos observar en la Fig. 4.2.

La Suramina sódica y el ddCTP, son dos de los inhibidores de la Transcriptasa inversa (Mitsuya y col., 1984; 1986; Chen y col., 1987; Fantini y col., 1989).

Cuando dichos inhibidores, fueron incorporados a la reacción de detección de Transcriptasa inversa, según la metodología expuesta, con la fracción purificada procedente de los núcleos de las células parasitadas, pudimos comprobar que se producía una inhibición total de TTP marcado, lo cual venía a demostrar una vez más, que la actividad enzimática de dicha fracción correspondía con una reversotranscriptasa, como podemos observar en la Fig. 4.3.

Al objeto de conocer si dicha reversotranscriptasa juega un papel importante en el ciclo intracelular de *T. cruzi*, y, si de alguna manera, estos inhibidores afectaban a la capacidad de multiplicación del parásito, decidimos realizar un cribado previo, de la posible citotoxicidad que dichos compuestos podían mostrar frente a las células HeLa, células empleadas como hospedador a lo largo de todos los ensayos.

Para ello, diferentes concentraciones de Suramina o ddCTP, fueron disueltos en medio MEM enriquecido con suero bovino fetal inactivado. Las concentraciones que no produjeron efectos citopatológicos sobre las células fueron de 100  $\mu\text{g/ml}$  para la Suramina sódica, y de 50  $\mu\text{M}$  para el ddCTP, datos que coincidieron con las concentraciones observadas por Fantini y col. (1989), y Chen y col. (1989).

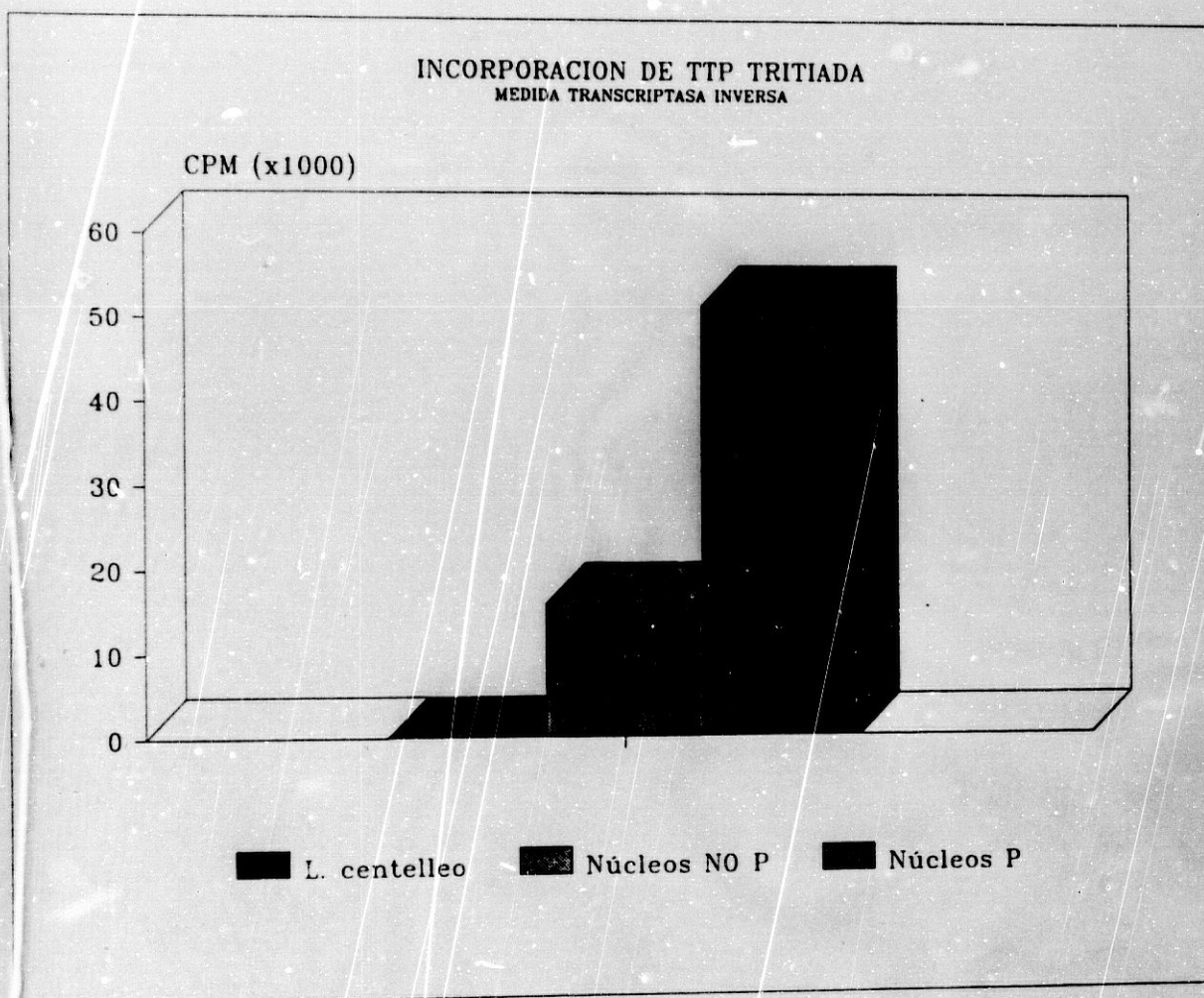


Figura 4.1: Incorporación de material radiactivo (TTP  $^3\text{H}$ ). Medida en CPM con fracción de núcleos de células HeLa parasitadas y no parasitadas.

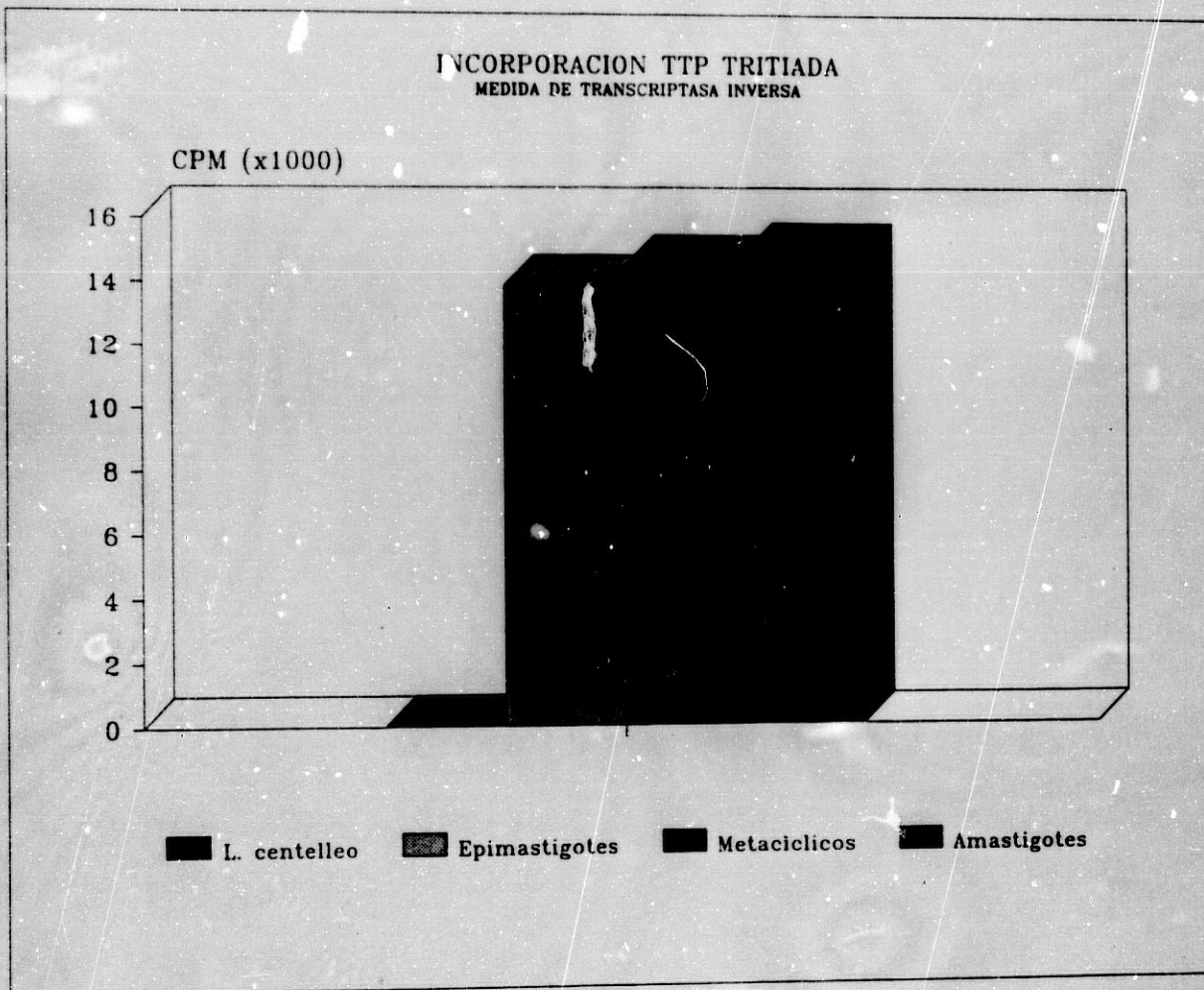


Figura 4.2: Incorporación de material radiactivo (TTP-<sup>3</sup>H) en Epimastigotes, Metacíclicos y Amastigotes de T. Cruzi.

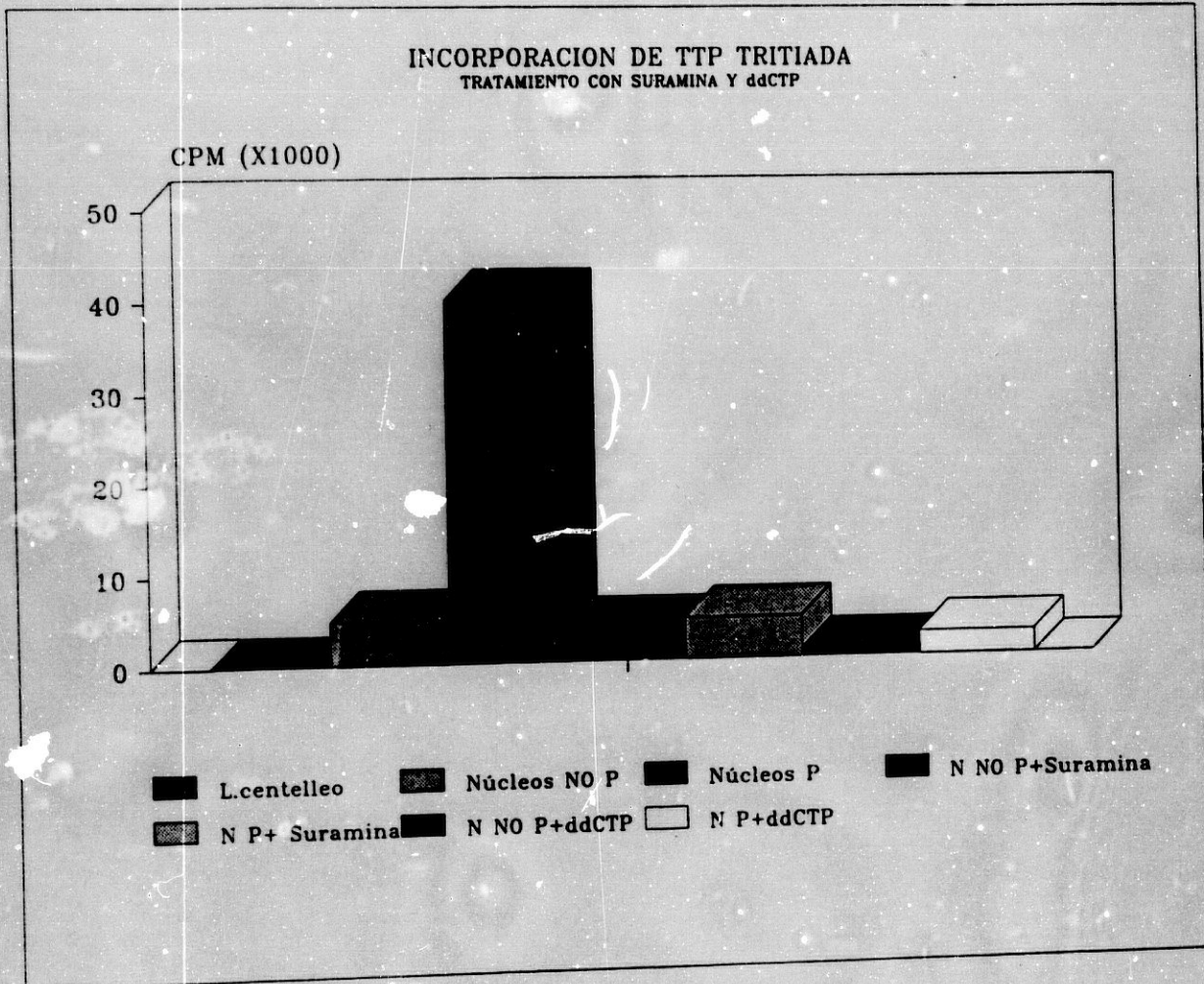


Figura 4.3: Incorporación de material radiactivo (TTP-<sup>3</sup>H) con fracción de núcleos de células HeLa parasitadas y no parasitadas y en presencia de Suramina y ddCTP.

Es conocido que aparte de la actividad reversotranscriptasa que muestra la Suramina, esta molécula fué inicialmente sintetizada como antiparasitario, utilizado frente a *Trypanosoma brucei* y frente a la Filariasis (Markell y col., 1986).

El modo de acción propuesto recientemente, como *antitrypanosoma brucei*, *Trypanosoma* que difiere en su ciclo biológico y manifestaciones patológicas en el hospedador a *T. cruzi* (por lo que este compuesto no se emplea en la terapéutica frente al mal de Chagas), es una inhibición de los portadores de glucosa al interior del glicosoma, orgánulo propio de la Familia *Trypanosomatidae*, donde, se agrupan todos los enzimas glucolíticos, así como algunos involucrados en la síntesis de purinas (Oppendoes, 1987).

Para los ensayos de comportamiento de los inhibidores de la transcripasa inversa, sobre el complejo amastigote - célula, los cultivos infectados se pusieron en contacto con dichos inhibidores, a tres tiempos diferentes.

El primero fué de 2 horas después de la parasitación; corresponde al momento justo de internalización del parásito en su célula.

El segundo tiempo fué de 2 horas de tratamiento, a las 15 horas post - parasitación.

El tercer tiempo, correspondió con un tratamiento de 15 horas después de la parasitación.

Los tiempos escogidos corresponden a los observados tanto por Jimenez - Ortiz (1981), como por Ortega - Torres (1983), en los que aparecen marcas radiactivas o antígenos detectables en los núcleos de las células parasitadas.

En este sentido, pudimos comprobar que, cuando los inhibidores de la transcriptasa inversa se ponen a las 15 horas de la realización de la infección, es decir, cuando el material había sido transferido, no se afecta apenas el índice parásito/célula, como se observa en la Fig. 4.4.

Sin embargo, cuando los cultivos infectados se ponen en contacto con los inhibidores de la transcriptasa inversa Suramina y ddCTP durante 2 horas o 15 horas después de la infección, obtuvimos inhibiciones del índice parásito/célula de hasta el 70% a las 48 y 72 horas de la infección, tanto para la Suramina y el ddCTP. (Fig. 4.5 y Fig. 4.6).

Por tanto, podemos decir que la inhibición en la multiplicación del parásito en el interior de la célula hospedadora es casi total, máxime si tenemos en cuenta



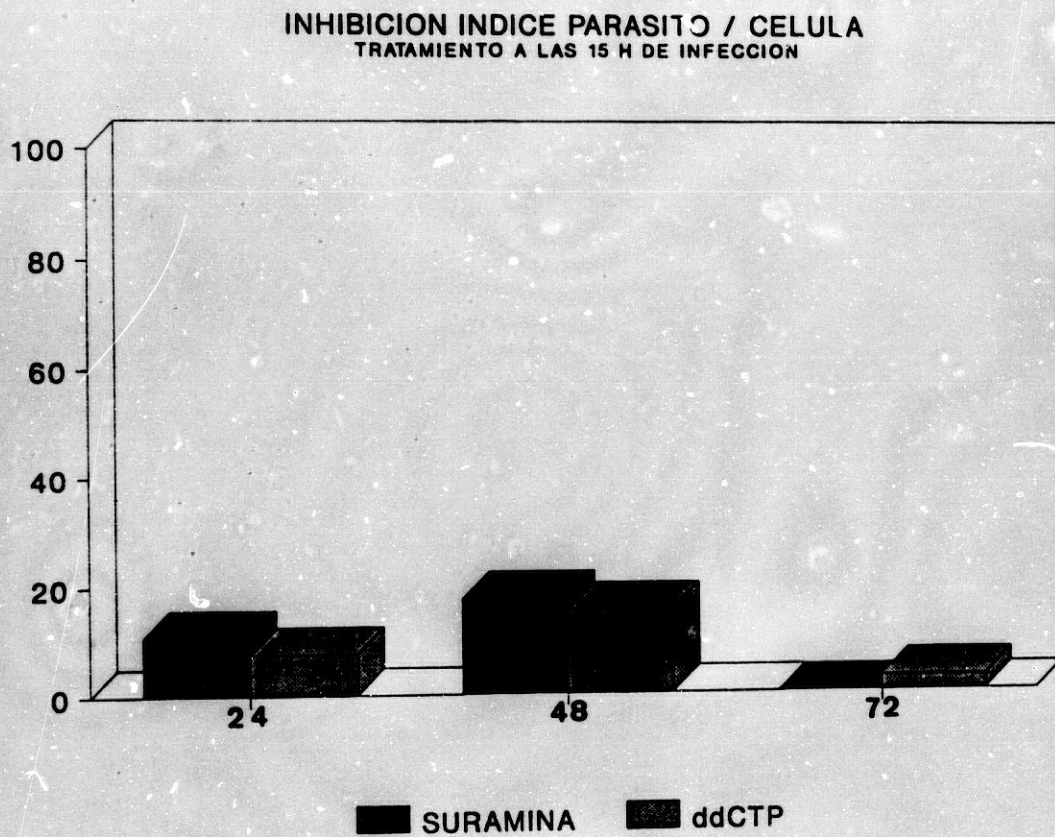


Figura 4.4: Inhibición en el Índice parásito / célula de cultivos de células HeLa infectadas por *T. Cruzi* tratadas con Suramina y ddCTP durante 2 horas, a las 15 horas de la infección.

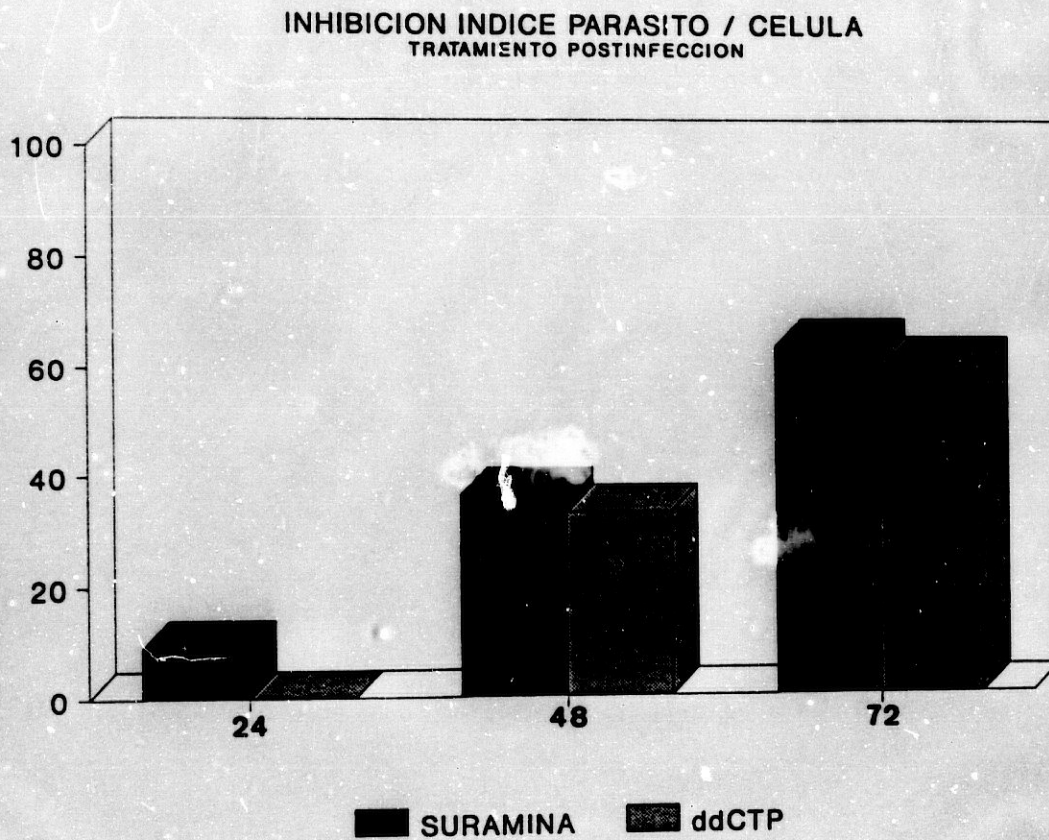


Figura 4.5: Inhibición en el Índice parásito / célula de cultivos de células HeLa infectadas por *T. Cruzi* tratadas con Suramina y ddCTP durante 2 horas postinfección.

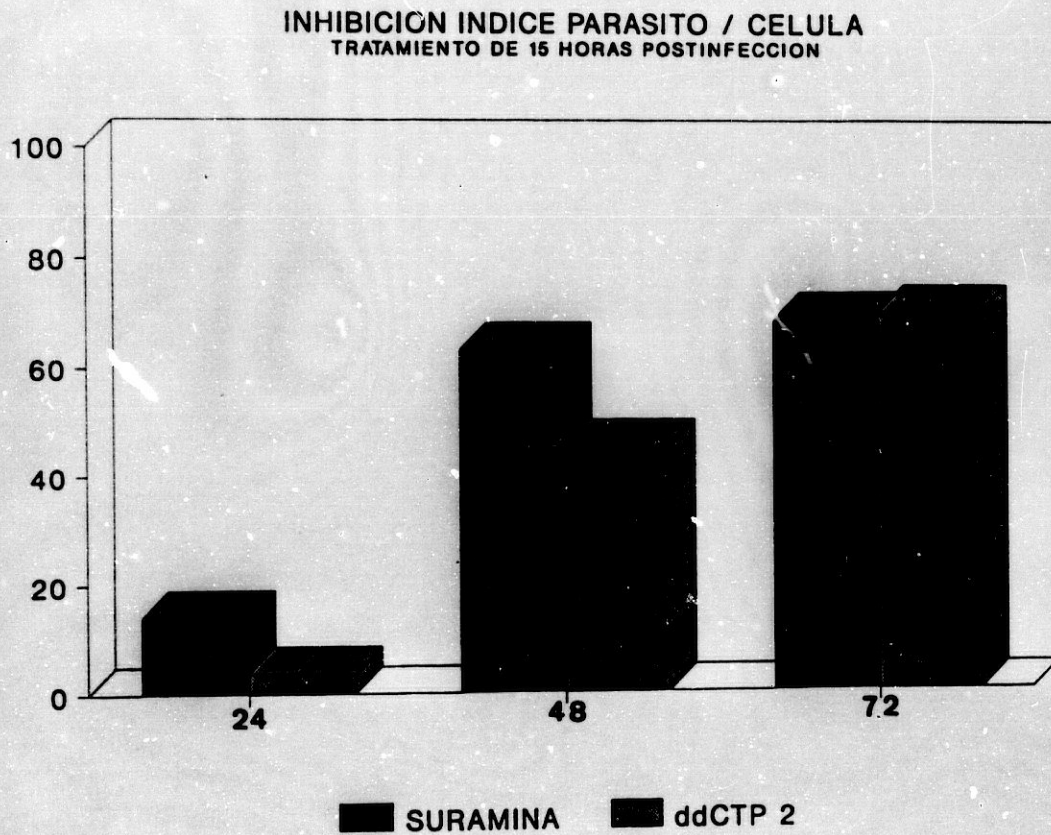


Figura 4.6: *Inhibición en el Índice parásito / célula de cultivos de células HeLa infectadas por T. Cruzi tratadas con Suramina y ddCTP durante 15 horas postinfección.*

que la inhibición producida por estas dos sustancias sobre la transcriptasa inversa no es total, como demuestran Fantini y col.(1989).

Estos autores mantienen una concentración determinada del inhibidor durante las 72 horas en que realizan la experiencia, para poder así conseguir una inhibición total.

Dado que durante la realización de los ensayos "in vitro" se producía una incorporación de TTP-<sup>3</sup>H en el material precipitable, decidimos intentar obtener el cDNA supuestamente sintetizado.

Para ello seguimos el método de Schleif y col. (1981), y terminada la reacción, precipitamos con Etanol y acetato amónico, eliminando el RNA mediante calentamiento en un baño hirviendo y tratamiento con NaOH.

Con el cDNA precipitado, realizamos una electroforesis, y si bien, no pudimos detectar el DNA, como consecuencia probablemente de la baja resolución que tiene el Bromuro de Etidio y la visulización en el transiluminador al ultravioleta (Maniatis, 1989), y pequeño tamaño que deben poseer los cDNA obtenidos, si pudimos comprobar la ausencia de RNA.

Por todo lo cual, decidimos utilizar otro método que mostrase un mayor poder de resolución. Para ello, empleamos el método de marcaje de DNA de forma no radiactiva, mediante digoxigenina-dUTP. De esta forma marcamos el supuesto cDNA procedente tanto de núcleos de células HeLa no parasitadas, como parasitadas por *T. cruzi*.

Posteriormente este DNA marcado se puso sobre membranas de nylon de 0,45  $\mu$ m, y se fijó a ellas mediante transiluminación con luz ultravioleta (Kbandjian, 1987).

Una vez fijadas las muestras a las membranas de nylon, hicimos una detección inmunológica, con anticuerpos de oveja antidigoxigenina - Fab conjugados con fosfatasa alcalina, para observar el material marcado.

Una vez llevada a cabo la reacción inmunológica, las membranas de nylon se tiñeron con NBT (Nitrozul de tetrazolio) y X - Fosfato (5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato).

Observamos que había un cDNA procedente de núcleos de células parasitadas (cDNA<sub>p</sub>), en una concentración de 0,4 ng/  $\mu$ l > cDNA<sub>p</sub> > 0,04 ng/  $\mu$ l, mientras que el de la muestra procedente de núcleos de células no parasitadas (cDNA<sub>no p</sub>) se observaba un color semejante a la muestra control de color.

Estos resultados nos hacen pensar que hay una transcriptasa inversa en *T. cruzi*. ¿Es propia del parásito o procede de un virus asociado al parásito?.

La transcriptasa inversa es un enzima que poseen un grupo de virus, los Retrovirus, por la cual pueden sintetizar DNA a partir de RNA. Cuando un virus infecta a una célula, lo primero que hace es obtener una copia de su genoma de RNA en DNA. Este DNA vírico lo inserta en el DNA de la célula hospedadora y dirige la producción de nuevos virus.

La retrotranscriptasa o DNA Polimerasa dependiente de RNA, se descubrió hace unos 20 años (Temin y Mizutani, 1970; Baltimore, 1970). Esta retrotranscripción, se consideró, en un principio, que sólo tenía lugar en las células eucariotas, multiplicándose los retrovirus en el núcleo de las mismas.

Sin embargo, recientemente (Inouye y col., 1989), se ha descubierto que un mecanismo de transcripción inversa existe en otros organismos: virus no pertenecientes a la familia de Retrovirus, células de levaduras, insectos y mamíferos no infectados.

Lim y Mass (1989) junto a otros grupos de investigación (Lampson y col., 1989 a; 1989 b; Sun y col., 1989), describen la transcriptasa inversa en genes de *Myxobacteria* y *Escherichia coli*.

Esto demuestra que este enzima es más antiguo que la separación entre procariontes y eucariotas (Rogers y col., 1985; Weiner y col., 1986). Esto también establece que la transcriptasa inversa existía antes que los Retrovirus y no al contrario.

Todas las reversotranscriptasas tienen alguna secuencia de aminoácidos idéntica, sugiriendo por tanto, un solo origen evolutivo.

Si se acepta el argumento de la antigüedad del gen de la transcriptasa inversa en myxobacterias, entonces el precursor de este gen fué el antecesor de todos los retroelementos.

En 1984, Yee y col., estudiando el tamaño del DNA de *Myxococcus xanthus* y otra mixobacteria, *Stigmatella aurantiaca*, encontraron una fracción de DNA de rápida renaturalización.

Estas bacterias eran de interés debido a su capacidad de diferenciación. Estos mismos autores observaron que este DNA de renaturalización rápida se encontraba en una banda satélite en una electroforesis de acrilamida. Ellos lo denominan msDNA.

Similares msDNAs se encontraron posteriormente en otras mixobacterias y más recientemente en un 5% de cepas de *Escherichia coli* (Sun, 1989).

Estos msDNAs contienen covalentemente unidos DNA y RNA coincidiendo en unos pocos nucleótidos en sus extremos 3'. Estos msDNA y los genes que los codifican han sido estudiados y se ha visto que tienen secuencias similares a los genes de otras transcriptasas inversas.

¿Cual es el papel celular de la transcriptasa inversa?. Muchos sugieren que la transposición inversa juega un papel beneficioso en el organismo celular (Temin, 1970, 1971; Gorczynski y col., 1980; Steele y col., 1987; Cairns y col., 1988).

Sin embargo, hay muchos elementos incluyendo caulimovirus, hepadnavirus, retrovirus, retrotransposones y retroposones, los cuales son parásitos, y su papel fisiológico relativo al organismo celular es su propia reproducción, pero no hay todavía una evidencia clara sobre la ventaja para organismos celulares de expresar la transcriptasa inversa.

En *Escherichia coli* y mixobacterias, los genes de la transcriptasa inversa, aparecen en una copia simple, indicando que su función no es la de amplificar el retrón relativo a otros genes bacterianos, es decir, el retrón no es un DNA egoísta.

Se han encontrado similitudes entre el DNA retroviral y ciertos elementos genéticos que constituían rasgos permanentes, aunque móviles, de los cromosomas de la mayoría de los organismos, si no de todos.

Se trata de ciertos elementos transponibles o transposones, detectados en bacterias, levaduras, insectos y vertebrados. Muestran tendencia a cambiar de posición dentro del genoma.

Estos elementos transponibles suelen presentar en sus extremos alguna secuencia especial, y muchos tienen LTR (grandes repeticiones terminales que se encuentran en los extremos del DNA de Retrovirus, los cuales están flanqueados por la misma secuencia corta, perteneciente al genoma del hospedador), repeticiones invertidas o pequeñas duplicaciones en los sitios de integración.

Hace tiempo, se reconoció la existencia de mutaciones inestables que afectaban al color del grano de maíz (Federoff y col., 1983; Pohlmann y col., 1984; Sutton y col., 1984), controladas por elementos transponibles.

En *Drosophila* hay tres tipos distintos de elementos móviles, responsables de mutaciones y otras ordenaciones cromosómicas: elementos copia, elementos FB

y elementos P (Rubin y col., 1983; Finnegan, 1985; Monut, 1985, Karess y col., 1984).

En el genoma de levaduras, existen secuencias repetitivas que son generalmente elementos genéticos móviles que portan genes internos, algunos de los cuales codifican para enzimas que los mueven de su localización cromosómica.

El elemento móvil más común en el genoma de levaduras es el Ty 1 (Kostriken, 1983; Boeke, 1985; Clare, 1985). Este elemento está emparentado con el elemento COPIA de *Drosophila* y con los genomas de Retrovirus que se multiplican en células de vertebrado (Gilboa, 1979; Parganiban, 1984; Moelling, 1971; Yamamoto, 1980); Laimuis, 1982; Gorman, 1982).

La similitud en la estructura genómica y función entre el elemento Ty y el genoma de Retrovirus sugiere no sólo que estos dos elementos tienen un origen evolutivo común.

Está demostrado que Ty sigue un patrón retroviral y se transpone por una transcripción inversa de su cadena de RNA para producir una cadena de DNA complementario (cDNA). Después de la conversión se insertará en una nueva situación cromosómica.

Estas comparaciones se han reforzado por los estudios de Meller y col. (1985), que observan que los elementos Ty transponen via un RNA intermediario.

Además han comprobado que contienen una secuencia la cual cuando se traduce, es homóloga a una región conservada encontrada en todas las transcriptasas inversas.

La existencia de retrotransposones se ha estudiado mucho en el mundo de los protozoos. En *Crithidia fasciculata*, un tripanosomátido de fácil cultivo, con mínimos requerimientos nutricionales, Gabriel y col. (1987), pusieron en evidencia que poseía transcripción discontinua.

El genoma de este parásito, está organizado en alineamientos de genes repetidos; aproximadamente 200 copias de genes, están en individuos diploides, con 1,35 Kb (De Lange y col., 1983; Dorfman y col., 1984; Nelson y col., 1983).

Este mecanismo de maduración inusual, discontinuo, es utilizado por otras especies como *Leishmania*, *T. cruzi*, *Leptomonas*, *Trypanosoma brucei*, lo cual indicaría una conservación de estas regiones (Nelson y col., 1984; De Lange y col., 1984; Miller col., 1986).

En 1980, Gabriel y col., estudian la maduración de los RNA en *Crithidia*, en definitiva una transcripción discontinua.

Dentro del genoma, en el estudio de los minixones, detectan copias de 3,5 Kb, encontrando elementos insertos en un sitio específico. La proteína que codifican estos insertos tiene 160 Kd, con homologías con las retrotranscriptasas, pero carece del codón de la metionina en su parte 5'.

El RNA total se hibrida poco con el DNA de estos minixones, lo que se explicará, o porque se transcribe poco (zona muda) o, porque existe un mecanismo desconocido de regulación. A pesar de las homologías, es diferente este DNA repetido al Ty de las levaduras.

Estos mismos autores, también encuentran una serie de minixones interrumpidos en sitios específicos por un elemento insertado al que denominan elemento 1 retrotransponible CRE 1. La fase de lectura abierta es similar en secuencia a regiones de la integrasa y retrotranscriptasa de poliproteínas "pol" retrovirales.

En 1989, Affolter y col., encuentran que el "cluster" de la tubulina de *Trypanosoma brucei* comienza con un gen beta intacto y termina con un gen beta interrumpido por una secuencia semejante a un retrotransposón.

En *T. brucei*, los genes de alfa y beta tubulina están ordenados en un "cluster" simple comprimido entre 10 genes alfa y beta alternando. El "cluster" comienza en su extremo 5' con un gen beta intacto. El extremo 3' del "cluster" termina en el centro de un gen beta formando un pseudogen inactivo.

La secuencia siguiente de 1,7 Kb muestra un alto grado de similitud con un elemento semejante a un retrotransposón al que denominan RTnL. Este retrotransposón interrumpe un gen que codifica una proteína de *T. brucei*. La función de este retrotransposón no se conoce todavía.

Smiley y col., en 1990, encuentran un retrotransposón en el extremo 5' de un gen VSG de *T. brucei*. Encuentran múltiples secuencias repetidas (Campbell y col., 1984), y el DNA crece aproximadamente en unas 10 bp por cada división del organismo (Bernards, 1983).

Este crecimiento podría estar en función de la enorme heterogenicidad de fragmentos de DNA telomérico observados en estos organismos.

Aksoy y col., en 1990, caracterizan un retrotransposón en *T. brucei* asociado con un SLACS (Spliced leader associated conserved sequence). Este SLACS está presente también en *T. cruzi* y en *Leptomonas seymorii* (Bellafonte, 1988).



En *Crithidia fasciculata*, se había caracterizado el elemento retrotransponible CRE 1 (Gabriel y col., 1990). Los SLACS y CRE 1 se parecen a Retrovirus y elementos que contienen LTR (repeticiones terminales).

En *T. brucei*, agente productor de la Tripanosomiasis africana, se han caracterizado además otros elementos móviles: RIME (Hasan y col., 1984), INGI/TRIS-1 (Kimmel y col., 1987; Murphy y col., 1987) y los elementos MEA (Carrington y col., 1987).

Algunos de ellos conservan residuos semejantes a secuencias de retrotranscriptasa, pero no se han detectado transcritos de RNA correspondientes a estas secuencias.

El estudio de bacteriófagos y virus ha permitido importantes progresos así como conocer el control de la expresión génica.

El empleo de los virus como modelos moleculares se ha visto facilitado por su pequeño genoma y su bajo número de genes, así como la abundancia de transcritos virales y proteínas en células infectadas. Esto ha motivado la búsqueda de la presencia de virus en otros organismos.

Así, se han encontrado también virus no infecciosos en levaduras (Wickner, 1981; Garfinkel y col., 1985). Sin embargo, partículas semejantes a virus se han encontrado en muchas levaduras y pueden ser los descendientes evolutivos de verdaderos virus de épocas anteriores, que hoy han perdido su capacidad de repartir de forma efectiva sus genomas de RNA a través de las paredes de la levadura.

Las partículas observadas más comunmente contienen un RNA de doble cadena, están rodeadas por una cápside conteniendo proteína y existe en múltiples copias en el citoplasma de la mayoría de cepas de levadura.

Este RNA semejante al viral, codifica una proteína tóxica, que es secretada a través de la pared celular y es letal para las células de levadura que no posean partículas semejantes a virus.

La presencia de virus vehiculizados por protozoos parásitos es un fenómeno conocido. El ejemplo más típico, ha sido el hecho de que algunas amebas de vida libre, como *Acanthamoeba castellanii*, son capaces de vehiculizar algunos poliovirus o el virus de la estomatitis vesicular.

Sin embargo, la existencia de virus propios de protozoos, es un fenómeno que se empieza a dilucidar desde hace años. En 1962, Garnham y col., detectaron

partículas semejantes a virus (VLPs) en *Plasmodium gallinacea*.

Los pseudovirus, denominados como cristaloides, medían entre 1-1,5  $\mu\text{m}$ , con un contenido irregular de aproximadamente 35 nm de diámetro.

Terzakis en 1969, describe VLPs también en *Plasmodium gallinacea*. Estas partículas miden entre 35-55 nm con una densa y fina área granular rodeada por una membrana trilaminar de 5 nm de diámetro.

En 1969, 1971 y 1974, Schuster y Schuster y Dunnebacke, describen VLPs en *Naegleria gruberi*, con un cierto parecido con las partículas Kappa asociadas a *Paramecium aurelia*. Estas partículas semejantes a virus miden 100 nm de diámetro y se observan en el núcleo y citoplasma de amebas.

En opinión de dichos autores, las partículas semejantes a virus no se inactivan por congelación-descongelación, tratamiento con detergentes, proteasas, o nucleasas; y, son así mismo, resistentes a la radiación ultravioleta. Sin embargo, el calentamiento a 100  $^{\circ}\text{C}$  destruye su actividad.

Además, dichos agentes no son capaces de sedimentarlas después de una centrifugación a 100.000 g durante 4 horas y no se detectan por microscopía electrónica de transmisión en fibroblastos tratados con dicha suspensión de partículas semejantes a virus.

Molyneux (1974) encuentra la presencia de partículas semejantes a virus en *Leishmania hertigi*. Dichas partículas son esféricas, agrupadas en alineamientos o individuales, con un tamaño de 55-60 nm de diámetro, con un corex de aproximadamente 17-20 nm.

En *Entamoeba histolytica*, en cepas que han sido axenizadas mediante el cultivo mixto con *T. cruzi*, Diamond (1972) caracteriza unos agentes virales con partículas poliédricas, que caracterizan como virus.

Dichas partículas virales, presentan el clásico ciclo lisogénico, con un tamaño entre 65-85 nm, aunque algunas muestran un tamaño de aproximadamente 50 nm, probablemente constituidos por DNA - virus, perdiendo su actividad por congelación a -40  $^{\circ}\text{C}$ , o por calentamiento a 56  $^{\circ}\text{C}$ , e inactivándose a pH inferiores a 5 o superiores a 9.

De igual manera, encuentra virus filamentosos en el núcleo de dicha ameba, los cuales previamente habían sido descritos por Mattern y col. (1972).

En 1986, Wang y Wang explican la presencia de un virus de doble cadena

de RNA en *Giardia lamblia*. El desarrollo de un vector genético para protozoos parásitos es el mejor camino para el estudio de una biología molecular y celular de estos parásitos.

Así, Furfine y col. (1990), aislan el virus de RNA de doble cadena identificado por Wang y Wang en 1986 de *Giardia lamblia*, y observan que éste es capaz de infectar otras cepas de este protozoo que están libres de dicho virus.

También se han asociado virus de doble cadena de RNA con otro protozoo parásito: *Trichomonas vaginalis* (Wang y Wang, 1986 b). Este virus tiene un genoma lineal de aproximadamente 5 Kb.

En 1988, Tarr y col., presentan observaciones consistentes sobre una infección viral en un aislado de *Leishmania* y lo nombran virus LR1.

Las variaciones en cuanto a virulencia del protozoo parásito *Entamoeba histolytica*, capaz de producir ulceraciones intestinales, hepáticas pulmonares y/o cerebrales, a ser totalmente asintomático, ha sido atribuido a partículas semejantes a virus, presentes en el citoplasma del protozoo e incapaces de infectar células eucariotas, de insectos o mamíferos (Martinez-Palomo., 1982).

Widmer y col. (1989) demuestran la presencia de un virus asociado a *Leishmania*. Sus resultados muestran una actividad RNA - polimerasa, actividad que puede indicar replicación viral, en aislados de *Leishmania braziliensis guyanensis*.

A su vez, detectan especies de RNA de 6 Kb. Así, sugieren que se trata de un virus de RNA de cadena simple, que posteriormente visualizan mediante tinción negativa para microscopía electrónica.

Por todo ello, y por los resultados obtenidos durante este trabajo, nos planteamos la existencia de un virus asociado a *T. cruzi*. Para ello tomamos un cultivo en masa de formas epimastigotas de *T. cruzi* en medio LIT. Se centrifugó para la obtención de un botón de parásitos y se sonicaron.

Posteriormente se sometieron a una centrifugación en una microfuga de 30 segundos para quitar los restos groseros y se dispuso sobre un gradiente de cloruro de cesio en medio TNE al 0,5x, centrifugándose a continuación durante 16 horas a 50.000 g.

Transcurrido este tiempo, se recogieron las fracciones que dieron mayor absorbancia a 260 nm y se procesaron para una tinción negativa con acetato de uranilo al 1% para microscopía electrónica. En estas preparaciones se observaron

partículas semejantes a virus, las cuales nos encontramos en proceso de caracterización.

Esta fracción, en la que observamos partículas semejantes a virus, después de la centrifugación en cloruro de cesio de un sonicado de formas epimastigotas de *T. cruzi*, fué sometida posteriormente a una prueba de transcriptasa inversa, observándose una vez concluida la experiencia una mayor cantidad de material radiactivo precipitable en esta fracción como se muestra en la Fig. 4.7.

Los intentos de "infectar" células HeLa con la fracción de mayor absorbancia procedente de la centrifugación en Cloruro de Cesio, y posterior diálisis, reveló que aproximadamente a las 48-72 horas de cultivo, mientras que los cultivos no "infectados" mostraban una apariencia normal, en las tratadas aparecían efectos citopatológicos moderados, redondeamiento de las células, aunque no la muerte de las mismas.

Las pruebas inmunológicas (Inmunofluorescencia indirecta) de las células frente a un inmunisero de ratón frente a *T. cruzi* previamente adsorbido sobre células normales, fijadas con acetona y permeabilizadas con Triton X-100, revelaron la presencia de antígenos de *T. cruzi* en las células tratadas con la fracción dializada.

Quizás el antígeno sea adsorbido sobre la membrana de la célula y posteriormente sea internalizado, similar a lo observado por Ribeiro dos Santos (1980) en cultivos in vitro infectados con *T. cruzi*, y constituya los antígenos RNA - proteínas integrados en el núcleo de la célula parasitada y detectados en enfermos chagásicos.

Posteriores estudios permitirán dilucidar la posible replicación "viral" en células parasitadas por *T. cruzi*, así como en el interior de las diferentes formas del parásito.

El intercambio macromolecular observado en experiencias previas, los datos referentes a la transcriptasa inversa detectada en el núcleo de las células, la presencia de antígenos aparentemente del parásito en el núcleo celular y las partículas semejantes a virus, podrían indicar que constituyen un hecho biológico, en el que las partículas semejantes a virus presentes en las formas amastigotas, necesitarían del núcleo celular para su multiplicación, mientras que en las formas epimastigotes del parásito podrían multiplicarse dentro del protozoo.

La presencia de esta transcriptasa inversa ligada a las partículas "virales", podrían ser el origen de las multicopias de genes que aparecen en el el genoma de los trypanosomatidos (Dragon y col., 1987), y, de igual manera, podrían constituir

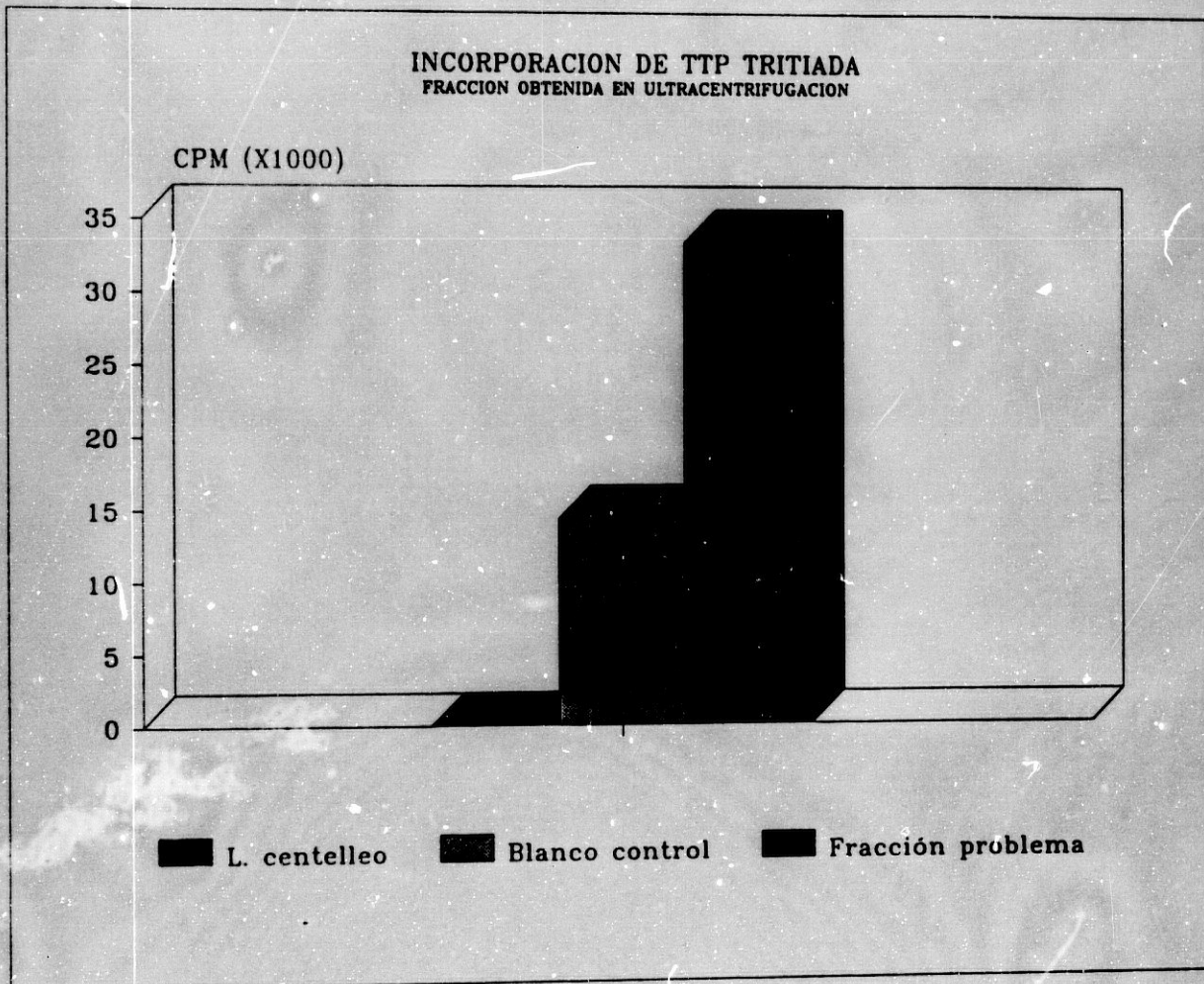


Figura 4.7: Incorporación de material radiactivo en forma de TTP  $^3\text{H}$  con la fracción con partículas semejantes a virus.

los elementos necesarios para la amplificación génica observada en la mayor parte de los trypanosomátidos (Coderre y col., 1983; Washtien y col., 1985; Hightower y col., 1988; Heilbronn y col., 1989).

Esperamos que en futuros estudios llevados a cabo sobre este tema que se abre con esta Tesis Doctoral, nos permita dilucidar algunos de estos problemas, que quizás puedan ser interesantes no solamente para la biología del parásito, sino también para la patología en el hospedador que dicho parásito induce.



---

## CONCLUSIONES

---

---



- (i) Se han detectado ribonucleoproteínas del parásito en el núcleo de las células HeLa parasitadas por *T. cruzi*.
- (ii) Las cromatografías de afinidad nos han permitido purificar algunas proteínas existentes en el núcleo de las células parasitadas por *T. cruzi*, con actividad de retrotranscriptasa, capaz de sintetizar DNA a partir de RNA mensajero del parásito.
- (iii) Las proteínas con actividad de transcriptasa inversa es capaz de producir material radiactivo precipitable equiparable a DNA sin necesidad de incubar dicha proteína con RNA exógeno.
- (iv) La actividad transcriptasa inversa es capaz de inhibirse por inhibidores tradicionales de dicha enzima tales como, el ddCTP y la Suramina sódica.
- (v) Se ha detectado una mayor actividad DNA-polimerasas en las formas metacíclicas del parásito, en comparación con las formas epimastigotas y amastigotas.
- (vi) El antígeno con actividad de transcriptasa inversa aparece en las tres formas del parásito.
- (vii) La incubación de las células con los inhibidores de la transcriptasa inversa, Suramina y ddCTP, en determinados momentos del ciclo celular, induce una considerable reducción en las tasas de multiplicación del parásito dentro de la célula.
- (viii) Mediante técnicas de microscopía electrónica, por centrifugación en gradiente de cloruro de cesio y tinción negativa, se han podido determinar partículas semejantes a virus asociados con las diferentes formas del parásito.

---

**BIBLIOGRAFIA**

---

---

- ABRAHAMSON I.A., KLOETZEL L.K.: *Presence of Trypanosoma cruzi antigen on the surface of both infected and uninfected cells in tissue culture.* Parasitol. 80:147-152. 1980.
- ADROHER F.J.: *Estudios fisiológicos y bioquímicos de Trypanosoma cruzi.* Tesis Doctoral. Facultad de Farmacia. Universidad de Granada. 1985.
- AFFOLTER M., RINDISBACHER L., BRAUN R.: *The tubulin gene cluster of Trypanosoma brucei starts with an intact beta-gene and ends with a truncated beta-gene interrupted by a retrotransposon-leke sequence.* Gene, 80:177-183. 1989.
- AKSOY S., WILLIAMS S., CHANG S., RICHARDS F.F.: *SLACS retrotransposon from Trypanosoma brucei gambiense is similar to mammalian LINEs.* Nucleic Acids Research. 18:785-792. 1990.
- ALEXANDER J.: *Effect of the antiphagocyte agent cytochalasin B on macrophage invasion by Leishmania mexicana promastigotes and Trypanosoma cruzi epimastigotes.* J. Parasitol 22:237-240. 1975.
- AMSELM I. A., PIFANO F., SUAREZ J.A., GURDIEL O.: *Myocardiopathy in Chagas' disease. I. Comparative study of pathologic findings in chronic human and experimental Chagas' disease.* Am Heart J 72:469-481. 1966.
- ANDRADE Z.A., ANDRADE S.G., OLIVEIRA G.B., ALONSO D.R.: *Histopathology of the conducting tissue of heart in Chagas' myocarditis.* Am Heart J. 95:316-324. 1978.
- ANDRADE Z.A., ANDRADE S.G.: *A patologia de doença de Chagas experimental no cão.* Mem Inst Oswaldo Cruz. 75:77-95. 1980.
- ANDREWS NW, COLLI W: *Adhesion and interiorization of Trypanosoma cruzi in mammalian cells.* J Protozool 29 : 264 - 269. 1982.
- ANDREWS N.W, MANSO ALVES M.J, SCHUMACHER R.I, COLLI W: *Trypanosoma cruzi: Protection in mice immunized with 8-methoxy-psoralen-inactivated trypomastigotes.* Exp Parasitol 60: 255 - 262. 1985.
- BAKER J.R., GREEN S.M.: *Trypanosomal antigen on macrophages cultivated "in vitro" with Trypanosoma dionisii.* Ann. Trop. Med. and Parasit.

tol. 71:141-145. 1977.

BALTIMORE D., REKOSH D.: *Viral RNA-dependent DNA polymerase*. Nature 226:1209. 1970.

BELLOFATTO V., COOPER R., CROSS M.J. Nucleic Acids Res. 16:7437-7456. 1988. Citado por Aksoy y col., 1990

BERNARDS A., MICHELS P.A.M., LINCKE C.R., BORST P.: *Growth of chromosome ends in multiplying trypanosomes*. Nature, 303:592-597. 1983.

BERTOLINI M.C., DE LUCCA F.L.: *Fractionation of immune RNA isolated from the spleen of mice infected with Trypanosoma cruzi*. The Journal of Infectious Diseases. 143:827-831. 1981.

BERTOLINI M.C., DE LUCCA F.L.: *Poly (A)-containing RNA from spleens of mice with Chagas' disease triggers in vitro macrophage resistance to Trypanosoma cruzi*. J. Protozool. 33:811-84. 1986.

BHATTACHARYA B, JANOVY J.: *Leishmania donovani: autoradiographic evidence for molecular exchanges between parasites and host cells*. Exp. Parasitol. 37 : 352 - 360. 1975.

BOBLOLO A.R., GUIMARES R.C., BRENER Z., GOLCHER R., BERTELLI M.M.S.: *Nuclear changes in Trypanosoma cruzi parasitized cells*. Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo. 20:230. 1978.

BOECKE J.D., GAFINKEL D.J., STYLES C.A., FINK G.R.: *Ty elements transpose through an RNA intermediate*. Cell 40:491-500. 1985.

BOREHAM P.F.L.: *The pathogenesis of African and American trypanosomiasis*. En: Biochemistry and physiology of protozoa. Levandowsky M. y Hutner S.H. eds. New York, Academic Press, 2:429-457. 1979.

BRADFORD M.: *A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. Anal Biochem 72:248. 1976.

- BROWN K.N., BROWN I.N., TRIGG P.I., PHILLIPS R.S., HILLS L.A.: *Immunity of malaria. II. Serological responses of monkeys sensitized by drug-supressed infection or by dead parasitized cells in Freund's complete adyuvant.* Exp. Parasitol. 28:318-338. 1970.
- BYEFELD J.E., SOGERBAUM O.H. *Analyt. Biochem.* 17:434. 1966.
- CAMPBELL D.A., VAN BREE M.P., BOOTHROYD J.C.: *The 5'-limit of transposition and upstream barren region of a trypanosome VSG gene: tandem 76 base-pair repeats flanking (TAA)<sup>90</sup>.* Nucleic Acids Research, 12:2759-2774. 1984.
- CARRINGTON M, RODITI I, WILLIAMS RO. *Nucleic Acids. Res.* 15 : 10179 - 10198. 1987. Citado por Aksoy y col., 1990.
- CASTANYS S.: *Estudio de algunas alteraciones en la célula hospedadora y purificación de factores liberados por Trypanosoma cruzi durante su interiorización.* Tesis Doctoral. Universidad de Granada. 1987.
- CASTANYS S., OSUNA A., GAMARRO F., RUIZ-PEREZ L.M.: *Purification of metacyclic forms of Trypanosoma cruzi by Percoll discontinuous gradient centrifugation.* Z Parasitenkd 70:443-449. 1984.
- CERISOLA J.A., RABINOVICH A., ALVAREZ M., DI CORLETO C.A. PRUNEDA J.: *Enfermedad de Chagas y transfusiones sanguíneas.* Bol Of Sanit Panam 73:203-221. 1972.
- CHAGAS C.: *Neue Trypanosomen.* Vorlau mitteilng Arch Schiffs Tropen-Hyg 13:120. 1909. Citado por Hoae C.A. 1972.
- CHANDRA P., APPEL W.: *Biosíntesis de DNA por virus - RNA tumoral (transcriptasa inversa) - Virus de la Leucemia de Friend del ratón.* Métodos de Biología Molecular. P. Chandra y W. Appel. Ed. Acribia 98-100. 1972.
- CHANDRA P.: *Sistemas de líquido de centelleo.* Métodos de Biología Molecular. P. Chandra y W. Appel. Ed. Acribia. 135. 1972.
- CHANG K.P. DWYER D.M.: *Leishmania donovani: hamster macrophage interactions in vitro: cell entry, intracellular survival and multiplication of mastigotes.* J Exp Med 147:515-530. 1978.

CHEN M.S., OSHANA S.C.: *Inhibition of HIV reverse transcriptase by 2',3'-dideozinucleoside triphosphates*. *Biochemical Pharmacology* 36:4361-4362. 1987.

CHESS Q., ACOSTA A.M., SETHI J.K., SANTOS-BUCH C.A.: *Reversible acquisition of a host cell surface membrane antigen by Trypanosoma cruzi*. *Infect Immun* 40:299-302. 1983.

CLARE J., FARABAUGH P.: *Nucleotide sequence of a yeast Ty element: evidence for an unusual mechanism of gene expression*. *Proc Natl Acad Sci*. 82:2829-2833. 1985.

CLEAVER J.E.: *Thymidine metabolism and cell kinetics*. Nort Holland Publ. Company Amsterdam. 1967.

CLEGG J.A., SMITHERS S.R., TERRY R.J.: *Acquisition of human antigens by Schistosoma mansoni during cultivation in vitro*. *Nature* 232:653-654. 1971.

CODERRE J.A., BEVERLEY S.M., SCHIMKE R.T., SANTI D.V.: *Overproduction of a bifunctional thymidylate synthetase-dihydrofolate reductase and DNA amplification in methotrexate-resistant Leishmania tropica*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 80:2132-2136. 1983.

COLLI W, KATZIN AM, ANDREWS NW, KUWAJIMA VY, GONÇALVES MF, ABUIN G, ALVES MJM, ZINGALES B: *Perspectives of vaccination against Chagas' disease through biotechnology. I. Definition of relevant antigens possibly involved in parasite - host cell interaction*. En: *New Approaches to Vaccine Development*. Bell R. y Torrigiani eds. Schawade, Basel, pp. 418 - 441. 1984.

COSSIO P.M., DIEZ C., SZAFARMAN A., KREUTZER E., CANDIOLO B., ARANA R.M.: *Chagasis cardiopathy. Demonstration of a serum gamma globulin factor which reacts with endocardium and vascular structures*. *Circulation* 49:13-21. 1974.

CRANE M.S.J., DVORAK J.A.: *Influence of monosacharides on the infection of vertebrate cells by Trypanosoma cruzi and Toxoplasma gondii*. *Mol Biochem Parasitol* 5:33-41. 1982.

- CSETE M., LEV B.I., PEREIRA M.E.A.: *An influenza virus model for Trypanosoma cruzi infection: interactive roles for neuroaminidase and lectin.* En Current Topics in Microbiology and Immunology. The Biology of Trypanosomes. Hudson L. ed. Berlin, Springer-Verlag, 177:153-165. 1985.
- CUNNINGHAM D.S., KUHN R.E., ROWLAND E.C.: *Suppression of humoral responses during Trypanosoma cruzi infections in mice.* Infect Immun 22:155-160. 1978.
- DANFORTH H.D., AIKAWA M., COCHRANE A.H., NUSSENZWEIG R.S.: *Sporozoites of mammalian malaria: attachment to internalization and fate within macrophages.* J. Parasitol 27:193-202. 1980.
- DANILOVA N.H., KALLUNIKOVA V.D.: *Cytological and cytochemical changes of human malignant cells under the influence of infection with Trypanosoma cruzi in tissue culture.* Med. Prazitol. 37:66-672. 1968.
- DE LANGE T. LIU A.Y.C., VAN DER PLOEG L.H.T., BORST P., TROMP M.C., VAN MOOM J.H. Cell 34:891-900. 1983. Citado por Gabriel y col., 1987.
- DE LANGE T., BERKVEN T.M., VEERMAN H.J.G., FRASH A.C.C., BARRY J.D., BORST P. Nucleic Acids Research. 12:4431-4443. 1984. Citado por Gabriel y col., 1987.
- DE LUCCA E.L., ZINI M.M., BERTOLINI M.C. DOS SANTOS R.S.: *In vitro transfer of Trypanosoma cruzi antigen sensitivity to human lymphocytes with spleen RNA from chagasic rats.* Rev Inst Med Trop Sao Paulo 20:264-265. 1978.
- DE LUCCA F.L., BERTOLINI M.C., ZINI M.N.: *In vitro transfer of reactivity to Trypanosoma cruzi antigens from rat cells to human cells with immune RNA.* The Journal Of Infectious Diseases. 1982.
- DHUNDALE. Cell 51:1105. 1987.
- DIAMOND L.S., MATTERN C.F.T. BARTGIS L.L.: *Viruses of Entamoeba histolytica. I. Identification of transmissible virus-like agents.* Journal of Virology. 9:326-341. 1972.

DIAMOND L.S., MATTERN C.F.T.: *Protozoal viruses*. Advances in Virus Research. 20: 87-112. 1976.

DIAS E.: *Estudios sobre o Schizotrypanum cruzi*. Mem Inst Oswaldo Cruz. 28:1. 1934. Citado por Hoare C.A. 1972.

DIAS J.P.C., DIAS R.B.: *Doença de Chagas: uma visao socioeconomica e cultural*. Anais Congreso Internacional sobre Donça de Chagas 14-35. 1979.

DORFMAN D.M., DONELSON J.E. Nucleic Acids Research. 12:4907-4920. 1984. Citado por Gabriel y col. En: *Evidence of discontinuos transcription in the Trypanosomatid Crithidia fasciculata*. The Journal of Biological Chemistry. 262:16192-16199. 1987.

DORMONT D, SPIRE B, BARRE - SINOUSI F, MONTAGNIER L, CHERMAN JC: *Inactivation of lymphadenopathy - associated virus by heat, gamma rays and ultraviolet light*. Annals Inst. Pasteur, Paris 136E, 75 (1985).

DRAGON E.A., SIAS S.R. KATO A., GABE J.D.: *The genome of Trypanosoma cruzi contains a constitutively expressed, tandemly arranged multicopy gene homologous to a major heat shock protein*. Molecular and Cellular Biology. 7:1271-1275. 1987.

DRAPER P., REES R.E.J.W.: *Electron-transparent zone of Mycobacteria may be a defense machanism*. Nature 228:860-861. 1970.

DVORAK J.A., CRANE M.S.J.: *Vertebrate cell cycle modulates infection by protozoan parasites*. Science 214:1034-1036. 1981.

DVORAK J.A., HYDE T.P.: *Trypanosoma cruzi, interacione with mammalian cells: I Interactions in the celular and subcelular levels*. Exp. Parasitol. 34:266-283. 1973.

EILMAN Y., EL-ON J.E., SPIRA D.T.: *Leishmania major: excreted factor, calcium ions, and the survival of amastigotes*. Exp Parasitol 59:161-168. 1985.

ELFORD B.C., HAYNES J.D., CHULAY J.D., ROBERT J.M.: *Selective*



*stage-specific changes in the permeability to small hydrophilic solutes of human erythrocytes infected with Plasmodium falciparum.* Mol Biochem Parasitol 15:43-60. 1985.

EL-ON J., BRADLEY D.J., FREEMAN J.C.: *Leishmania donovani: action of excreted factor on hydrolytic enzyme activity of macrophages from mice with genetically different resistance to infection.* Exp Parasitol 49:167-174. 1980.

ENDO T., SETHI K.K., PIEKARSKI G.: *Toxoplasma gondii: calcium ionophore A23187-mediated exit of trophozoites from infected murine macrophages.* Exp Parasitol 53:179-188. 1982.

FANTINI J., ROGNONI J-B., ROCCABIANCA M., POMMIER G., MARVALDI J.: *Suramin inhibits cell growth and glycolytic activity and riggers differentiation of human colic adenocarcinoma cell clone HT29-D4.* The Journal of Biological Chemistry. 264:10282-10286. 1989.

FARAH F.S., SAMRA S.A., NEWAYRI-SALTI N.: *The role of the macrophage in cutaneous Leishmaniosis.* Immunology 29:755-764. 1975.

FEDOROFF N.: *Controlling elements in maize.* En: Mobile Genetics elements. ed. J.A. Shapiro. New York. Academic Press. 1-63. 1983.

FEINBERG A.P., VOGELSTEIN B.: *A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity.* Anal. Biochem. 132:6. 1983.

FINNEGAN D.J.: *Transposable elements in Eukaryotes.* Int. Rev. Cytol. 93:281-326. 1985.

FINK G.R., BOECKE J.D. GARFINKEL D.J.: *The mechanisms and consequences of retrotransposition.* Trens Genet 2:118-123. 1986.

FURFINE E.S., WANG CH.C.: *Transfection of the Giardia lamblia double-stranded RNA virus into Giardia lamblia by electroporation of a single-stranded RNA copy of the viral genome.* Molecular and Cellular Biology. 10:3659-3663. 1990.

GABRIEL A., SISODIA S.S., CLEVELAND D.W.: *Evidence of discontinuous transcription in the Trypanosomatid Crithidia fasciculata*. The Journal of Biological Chemistry. 262:16192-16199. 1987.

GABRIEL A., YEN T.J., SCHWARTZ D.C., SMITH C.L., BOEKE J.D., SOLLNER-WEBB B., CLEVELAND D.W.: *A rapidly rearranging retrotransposon within the minixon gene locus of Crithidia fasciculata*. Molecular and Cellular Biology 10:615-624. 1990.

GAMARRO F., OSUNA A., CASTANYS S., PEREZ-LOPEZ M.I.: *Isolation and purification of amastigotes of Trypanosoma cruzi from Vero cells*. Z Parasitenkd 71:15-17. 1985.

GARFINKEL D.J., BOECKE J.D., FINK G.R.: *Ty element transposition. Reverse transcriptase and virus-like particles*. Cell 42: 507-517. 1985.

GARNHAM P.C.C., BIRD R.G., BAKER J.R. Trans Roy. Soc. Trop. Med. Hyg. 56:116. 1962. Citado por Diamond y col., 1976.

GEY G.O., COFFMAN W.D., KUBICEK M.T. Cancer Research 12:264. 1952.

GILBOA E., MILTRA S.W., GOFF S. BALTIMORE D.: *A detailed model of reverse transcription and tests of crucial aspects*. Cell 18: 93-100. 1979.

GINSBURG H., KRUGLIAK M., EIDELMAN O., CABANTCHIK Z.I.: *New permeability pathways induced in membranes of Plasmodium falciparum infected erythrocytes*. Mol. Biochem. Parasitol. 8:177-190. 1983.

GORDON A.H., HART P.D., YOUNG M.R.: *Ammonia inhibits phagosome-lysosome fusion in macrophages*. Nature 286:78-80. 1980.

GORMAN CM, MERLINO GT, WILLINGHAM MC, PASTAN I, HOWARD BH: *The Rous sarcoma virus long terminal repeat is a strong promoter when introduced into a variety of eukaryotic cells by DNA-Mediated transfection*. Proc. Natl. Acad. Sci. 79 : 6777 - 6781. 1982.

GOUDSWAARD J., VAN DER DONK J.A., NOORDIJ A.: *Protein A reactivity of various mammalian immunoglobulins*. Scand. J. Immunol. 8:21-28.

1978.

HADDOK K.C.: *Disease and development in the tropics: a review of Chagas' disease*. Soc Sci Med 13D:53-60. 1979.

HASAN G., TURNER, CORDINGLEY M.J. Cell, 37:333-341. 1984. Citado por Aksoy y col., 1990.

HEILBRONN R., HAUSEN H.Z.: *A subset of Herpes simplex virus replication genes induces DNA amplification within the host cell genome*. Journal of Virology. 63:3683-3692. 1989.

HELENIUS A., MOREIN B., FRIES E., SIMONS K., ROBINSON P., SCHIMACHER V., TERHORST C., STROMINGER J. Proc. Natl Acad. Sci. USA 75: 3846-3850. 1978.

HENRIQUEZ D., PIRAS R., PIRAS M.M.: *The effect of surface membrane modification of fibroblastic cells on the entry process of Trypanosoma cruzi trypomastigotes*. Mol. Biochem. Parasitol. 2:359-366. 1981.

HIGHTOWER R.C., RUIZ-PEREZ L.M., WONG M.L., SANTI D.V.: *Extrachromosomal elements in the lower eukaryote Leishmania*. Journal of Biological Chemistry. 263:16970-16976. 1988.

HUDSON L.: *Trypanosoma cruzi: the immunological consequences of infection*. J. Cell. Biochem. 21:299-304. 1983.

HUDSON L. BRITTEN V.: *Immune response to South American trypanosomiasis and the relationship to Chagas' disease*. British Med Bull 41:175-180. 1985.

INOUYE S. HSU M.Y., EAGLE S.: *Reverse transcriptase associated with the biosynthesis of the branched RNA-linked msDNA in Mixococcus xanthus*. Cell. 56:709-717. 1989.

JIMENEZ-ORTIZ A.: *Cultivo in vitro de Trypanosoma cruzi: Aspectos de las interrelaciones parásito-célula hospedadora*. Tesis Doctoral. Facultad de Farmacia. Universidad de Granada. 1981.

JIMENEZ - ORTIZ A, GUEVARA DC, OSUNA A, ALONSO C: *Trypanosoma cruzi* induces changes in the nuclear acids content of host HeLa cells in vitro. *Ann Parasitol. Hum. Comp.* 59 : 573 - 581. 1984.

JONES T.C., HIRSCH J.G.: *The interaction between Toxoplasma gondii and mammalian cells. II. The absence of lysosomal fusion with phagocytic vacuoles containing living parasites.* *J. Exp. Med.* 136:1173-1194. 1972.

JONES T.C., YEH S., HIRSCH J.G.: *The interactions between Toxoplasma gondii and mammalian cells. I. Mechanism of entry and intracellular fate of the parasite.* *J. Exp. Med.* 136:1157-1172. 1972.

KERESS R.E., RUBIN G.M.: *Analysis of P transposable element functions in Drosophila.* *Cell* 38:135-146. 1984.

KATZIN P.M., ALIPERTI G., SCHLESINGER M.J.: *Antibodies to two major chicken heat shock protein cross-react with similar proteins in widely divergent species.* *Mol. Cell. Biol.* 2:267-274. 1980.

KHANDJIAN E.W.: *Optimized hybridization of DNA blotted and fixed to nitrocellulose and nylon membranes.* *Bio/Technology.* 5:165. 1987.

KIERSZENBAUM F., BUDZKO D.B.: *Trypanosoma cruzi: deficient lymphocyte reactivity during experimental acute Chagas' disease in the absence of suppressor T cells.* *Parasite Immunol.* 4:441-451. 1982.

KIMMEL B.E., OLE-MOIYOI O.E., YOUNG J.R. *Mol. Cell. Biol.* 7:141475. 1987. Citado por Aksoy y col., 1990.

KOBERLE F.: *The causation and importance of nervous lesions in American trypanosomiasis.* *Bull WHO* 42:739-743. 1970.

KOSTRIKEN R., STRATHERN J.N., KLAR A.J.S., HICKS J.B., HEFFRON F.: *A site-specific endonuclease essential for mating-type switching in Saccharomyces cerevisiae.* *Cell* 35:167-174. 1983.

KRAWCZYK Z., WU C.: *Isolation of RNA for Dot hybridation by Heparin-DNase I treatment of whole cell lysate.* *Analytical Biochemistry.* 165:20-27. 1987.

KRETTLI A.U., BRENER Z.: *Resistance against Trypanosoma cruzi associated to antiliving trypomastigotes antibodies.* J. Immunol. 128: 2009-2012. 1982.

KRETTLI A.U., EISEN H.: *Fabulation of trypanosoma cruzi: a mechanism of escape from the host immune system.* VII Reuniao Anual de Pesquisa Basica em Doença de Chagas. Caxambu, Brasil. p. 58. 1980.

KRONVALL C., FROMMEL D.: *Definition of staphylococcal protein A reactivity for human immunoglobulin G fragments.* Immunochemistry 7:124-127. 1970.

KRUNGKRAI J., YUTHAVONG Y.: *Enhanced calcium uptake by mouse erythrocytes in malarial Plasmodium berghei infection.* Mol. Biochem. Parasitol. 3:227-236. 1983.

LADDA R., AIKAWA M., SPRINZ H.: *Penetration of erythrocytes by merozoites of mammalian and avian malarial parasites.* J. Parasitol. 55:633. 1969.

LAEMMLI U.K., FAVRE M.: *Maturation of the head of bacteriophage T4.* J. Mol. Biol. 80:575-599. 1973.

LAIMINS L.A., KHOURY G., GORMAN C., HOWARD B., GRUSS P.: *Host-specific activation of transcription by tandem repeats from simian virus 40 and moloney murine sarcoma virus.* Proc. Natl. Acad. Sci. 79:6453-6457. 1982.

LAMPSON B.C. Science, 243:1033-1038. 1989. Citado por Antoine-Louis Lecocq. Mundo Científico 9:253. 1989.

LANGONE J.J.: (125I) *Protein A: a tracer for general use in immunoassay.* J. Immunol. Methods. 24:269-285. 1978.

LEIDA M.N., MAHONEY J.R. EATON J.W.: *Intraerythrocytic plasmoidal calcium metabolism.* Biochem. Biophys. Res. Comm. 103:402-406. 1981.

LEIKIKA M.I. Antibiotiki. 10:924. 1965. Citado por Danilova y col. (1968).

LEWIS D.H., PETERS W.: *The resistance of intracellular Leishmania parasites to digestion by lysosomal enzymes.* Ann. Trop. Med. Parasitol. 71:295-312. 1977.

LIBBY P., ALROY J., PEREIRA M.E.A.: *A neuroaminidase from Trypanosoma cruzi removes sialic acid from surface of mammalian myocardial and endothelial cells.* J. Clin. Invest. 77:127-135. 1986.

LIM D., MAAS W.K.: *Reverse transcriptase in bacteria.* Cell. 56:891-904. 1989.

LIMA M.F., KIERSZENBAUM F.: *Biochemical requirements for intracellular invasion by Trypanosoma cruzi: protein synthesis.* J. Protozool. 29:566-579. 1982.

LOPEZ-REVILLA R., RODRIGUEZ BAEZ.: *Manual para el cultivo axénico de Entamoeba histolytica.* Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología. In-surgentes Sur 1677. Mexico 20, D.F. 1981.

MANIATIS T., FRITSCH E.F., SAMBROOK J.: *Molecular cloning. A Laboratory manual.* Cold Spring Harbor Laboratory. 1982.

MAREGRAITH B.G., GILLES H.M.: *Management and Treatment of Tropical Diseases.* Blackwek Scientific Publications. Oxford and Edinburgh. 1980.

MARGARINO TORRES C.B.: *Patogenia de la miocarditis crónica en la enfermedad de Chagas.* Quinta Reunión de la Sociedad Argentina de Patología Regional de Norte. 2:902-916. 1929.

MARKELL V.J.: *Medical Parasitology.* 6th Edition. Eds. Saunders. 1986.

MARTINEZ-PALOMO, M.D., D.Sc.: *The biology of Entamoeba histolytica.* Research Studies press, 1982.

MATTERN C.F.T. DIAMOND L.S., DANIEL W.A.: *Viruses of Entamoeba histolytica. II. Morphogenesis of the polyhedral particle and the filamentous agent.* Journal of Virology. 9:342-358. 1972.

MEDINA M.M., CEREZO A., SANCHEZ-MORCILLO J.: *Elaboración, caracterización y estudio de la estabilidad de liposomas.* Ann. R. Acad. Farm.

52. 1986.

MEIRELLES M.N.L., SOUZO-PADRON T., DE SOUZA W.: *Participation of cell surface anionic sites in the interaction between Trypanosoma cruzi and macrophages*. J. Submicrosc. Cytol. 16:533-545. 1984.

MELLOR J., FULTON S.M., DOBSON M.J., WILSON W., KINGSMAN S.M., KINGSMAN A.J.: *A retrovirus-like strategy for expression of a fusion protein encoded by yeast transposon Ty*. Nature 313: 243-246. 1985.

MELLOR J., MALIM M.H., GULL K., TUIE M.F., McCREADY S., DIBBAYAMAN T., KINGSMAN S.M., KINGSMAN A.J.: *Reverse transcriptase activity and Ty RNA are associated with virus-like particles in yeast*. Nature 318:583-586. 1985.

MEYER E.A.: *Isolation and axenic cultivation of Giardia trophozoites from rabbit, chinchilla and rat*. Exp. Parasitol. 27:179-183. 1970.

MILES M.A.: *The epidemiology of South American trypanosomiasis biochemical and immunological approaches and their relevance to control*. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 77:5-23. 1983.

MILLER SI, LANDFEAR SM, WIRTH DF. Nucleic Acids Research. 14: 7341 - 7360. 1986. Citado por Gabriel y col., 1987.

MITSUYA H., POPOVIC M., YARCHOAN R., MATSUSHITA S., GALLO R.C., BRODER S.: *Suramin protection of T cells in vitro against infectivity and cytopathic effect of HTLV-II*. Science 226:172-174. 1984.

MITSUYA H., WEINHOLD K.J., FURMAN P.A., ST. CLAIR M.H., LEHERMAN S.N., GALLO R.C., BOLOGNESI D., BARRY D.W., BRODER S.: *3'-Azido-3'-deoxythymidine (BW A509U): An antiviral agent that inhibits the infectivity and cytopathic effect of human T-lymphotropic virus type III/lymphadenopathy-associated virus in vitro*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 82:7096-7100. 1985.

MITSUYA H., BRODER S.: *Inhibition of the in vitro infectivity and cytopathic effect of human T-lymphotropic virus type III/lymphadenopathy-associated virus (HTLV-III/LAV) by 2',3'-dideoxynucleosides*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 83:1911-1915. 1986.

MOELLING K., BOLOGNESI D., BAUER H., BÜSEN W., PLASSMANN H.W. HAUSEN P.: *Association of viral reverse transcriptase with an enzyme degrading the RNA moiety of RNA-DNA hybrids*. Nature New Biol. 243:240-243. 1971.

MOLYNEUX D.H. Nature (London).249:588. 1974. Citado por Diamond y col., 1976.

MOUNT S.M., RUBIN G.M.: *Complete nucleotide sequence of the Drosophila Transposable element copia: homology between copia and retroviral proteins*. Mol. Cell Biol. 5:1630-2638. 1985.

MUÑIZ J., DE AZEVEDO A.P.: *Novo conceito da patogenia da doença de Chagas. Infiamação alérgica granulomatosa (A) e miocardite hiperérgica (B) produzidas em "thesus" (Macaca mullata) inoculados com formas montadas de cultivo do Schizotrypanum cruzi*. Hospital (Rio) 32:165-183. 1947. Citado por Hudson L. y Britten V. 1985.

MURPHY N.B., PAYS A., TEBABI P., COQUELET H., GYALEX M., STEINERT M., PAYS E. J. Mol. Biol. 195:855-872. 1987. Citado por Aksoy y col., 1990.

NELSON R.G., PARSON M., BARR P.J., STUART K., SELKIRK M., AGABIAN N. Cell 34:901-909. 1983. Citado por Gabriel y col., 1987.

NELSON R.G., PARSONS M. SELKIRK M., MEWPORT G., BARR P.J., AGABIAN N. Nature 308:665-667. 1984. Citado por Gabriel y col., 1987.

NICOLIE C.: *Culture du parasite du bouton d'Orient*. Hebd. Seanc. Acad. Sci. Paris. 146:842-843. 1908.

NOGUEIRA N., COHN Z.: *Trypanosoma cruzi: mechanism of entry and intracellular fate in mammalian cells*. J. Exp. Med. 143:1402-1420. 1976.

OAKLEY B.R., KIRSCH D.R., MORRIS N.R.: *A simplified ultrasensitive silver stain for detecting proteins in polyacilamide gels*. Analitic Biochem 105: 361-363. 1980.

O.M.S.: *Recherche sur les Maladies tropicales. Maladie de Chagas*. PNUD / Banque Mondiale / OMS 6 : 1 - 20. 1985.



OOGOSE K., HAFURI Y., TAKEMORI E., NAKATA E., INOUE Y., NAKAMURA S.: *Mechanism of inhibition of reverse transcriptase by quinone antibiotics*. The Journal of Antibiotics 40:1778-1781. 1987.

OPPERDOES F.R.: *Compartmentation of carbohydrate metabolism in Trypanosomes*. Ann. Rev. Microbiol. 41:127-151. 1987.

ORTEGA-TORRES M.G.: *Estudios experimentales sobre la interacción de Trypanosoma cruzi con su célula hospedadora*. Tesis Doctoral. Facultad de Farmacia. Universidad de Granada. 1983.

OSUNA A., JIMENEZ-ORTIZ A., LOZANO J.: *Medios de cultivo para la obtención de formas metacíclicas de Trypanosoma cruzi*. Rev. Iber. Parasitol. 39:129-133. 1979.

OSUNA A., ORTEGA M.G., GAMARRO F., CASTANYS S., MASCARO M.C.: *Some factors affecting the in vitro invasion of HeLa cells by Trypanosoma cruzi*. Int. J. Parasitol. 14: 253-257. 1984.

OSUNA A., GAMARRO F., CASTANYS S., RUIZ-PEREZ L.M.: *Effect des enzymes proteolytiques sur la penetration du Trypanosoma cruzi dans les macrophages peritoneaux de souris*. Ann. Parasitol. Hum. Comp. 60:383-388. 1985.

OSUNA A., GAMARRO F., CASTANYS S., RUIZ-PEREZ L.M.: *Inhibition of lysosomal fusion by Trypanosoma cruzi in peritoneal macrophages*. Int. J. Parasitol. 1986.

OSUNA A., CASTANYS S., RODRIGUEZ-CABEZAS M.N., GAMARRO F.: *Trypanosoma cruzi: calcium ion movement during internalization in host HeLa cells*. International Journal for Parasitology. 20:673-676. 1990.

OUISSI M.A., AFCHAIN D., CAPRON A., GRIMAUD J.A.: *Fibronectin receptors on Trypanosoma cruzi trypomastigotes and their biological function*. Nature 308:1096-1101. 1985.

P.A.H.O.: *Parasitic diseases and vector control Chagas' disease*. Epidemiol. Bull. PAHO. 3:1-5. 1982.

PANGANIBAN A.T., TEMIN H.M.: *Circles with two tandem LTRs are precursors to integrated retrovirus DNAs.* Cell 36:673-679. 1984.

PEREIRA MEA: *A developmentally regulated neuroaminidase activity in Trypanosoma cruzi.* Science 219 : 1444 - 1446. 1983.

PEREIRA M.G.: *Characteristics of urban mortality from Chagas' disease in Brasil's Federal District.* Bull. PAHO 18:1-9. 1984.

PIRAS R., HENRIQUEZ D., PIRAS M.M.: *Studies on host-parasite interactions: role of fibroblastic cell surface functions and Trypanosoma cruzi forms in the infective process.* En: Host-Invader Interplay. Van der Bosche H. ed. Amsterdam, Elsevier North-Holland Biomedical Press, pp 131-134. 1980.

PIRAS R., PIRAS M.M., HENRIQUEZ D.: *Trypanosoma cruzi-fibroblastic cell interaction necessary for cellular invasion.* En: Cytopathology of parasitic disease. Ciba Foundation Symposium, Pitman, London, 99:31-55. 1983.

PIRAS M.M., HENRIQUEZ D., PIRAS R.: *The effect of proteolytic enzymes and protease inhibitors on the interaction Trypanosoma cruzi-fibroblasts.* Mol. Biochem. Parasitol. 14:151-163. 1985.

POHLMANN R.F., FEDOROFF N.V., MESSING J.: *The nucleotide sequence of the maize controlling element Activator.* Cell 37:635-643. 1984.

RANGEL H.A., ARAUJO P.M., REPKA D., COSTA M.G.: *Trypanosoma cruzi: Isolation and characterization of a proteinase.* Exp. Parasitol. 52:199-209. 1981.

REED S.G., ROTERS S.B., GOIDL E.A.: *Spleen cell-mediated suppression of IgG production to a non-parasite antigen during chronic Trypanosoma cruzi infection in mice.* J. Immunol. 131:1978-1982. 1983.

REER S.I., FERGUSON J., DAVIS W.R., STARK G.R.: *T antigen binds to simian virus 40 DNA at the origin of replication.* Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 72:1605-1609. 1975.

RIBEIRO DOS SANTOS R., MARQUEZ J.O.: *Mecanismos inmunológicos comprometidos en la destrucción neuronal que ocurre en la enfermedad de Chagas*. Revista Neurológica Argentina 3:439-442. 1977.

RIBEIRO DOS SANTOS R., HUDSON L.: *Trypanosoma cruzi: binding of the parasite antigens to mammalian cell membranes*. Parasite Immunol. 2:1-10. 1980 a.

RIBEIRO DOS SANTOS R., HUDSON L.: *Trypanosoma cruzi: Immunological consequences of parasite modification of host cells*. Clin. Exp. Immunol. 40:36-41. 1980 b.

RIBEIRO DOS SANTOS R., HUDSON L.: *Denervation and the immune response in mice infected with Trypanosoma cruzi*. Clin. Exp. Immunol. 44:349-354. 1981.

ROEDER G.S., FARABAUGH P.J., CHALEFF D.T., FINK G.R.: *The origins of gene instability in yeast*. Science 209:1375-1380. 1980.

ROGERS J.J. Int. Rev. Cytol. 93:187-279. 1985. Citado por Temin H.M.: *Retrons in bacteria*. Nature 339:254-255. 1989.

ROITT I., BROSTOFF J., MALE D.: *Immunology*. Second Edition. Churchill Livingstone, Gower Medical Publishing. London. New York. 1989.

RUBIN G.M.: *Dispersed repetitive DNAs in Drosophila*. En: Mobile genetics elements. Ed. J.A. Shapiro New York : Academic Press 329-361. 1983.

SAMBROOK T., FRITSCH E.F., MANIATIS T.: *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*. Second Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1989.

SANGER F., NICKLEN S., COULSON A.R.: *DNA sequencing with chain-terminating inhibitors*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 74:54463-5467. 1977.

SARIN P.S., TAGUCHI Y., SUN D., THORNTON A., GALLO R.C., OBERG B.: *Celular oncogenes, T-cell leukemia-lymphoma virus, and leukemias and lymphomas of man*. Biochem. Pharmac. 34:4075. 1985.

- SCHARFSTEIN J., RODRIGUES M.M., ALVES C.A., DE SOUZA W., PREVIATO J.O., MENDOÇA-PREVIATO L.: *Trypanosoma cruzi*: Description of a highly purified surface antigen defined by human antibodies. *J. Immunol.* 131:972-976. 1983.
- SCHERER S., MANN C., DAVIS R.W.: *Reversion of a promoter deletion in yeast.* *Nature* 298:815-819. 1982.
- SCHLEIF R.F., WENSINK P.C.: *Synthesizing radiolabelled DNA complementary to RNA.* Practical Methods in Molecular biology. Springer-Verlag. New York Heidelberg Berlin. 1981.
- SCHUSTER F.L.: *Ultrastructure of cysts of Naegleria spp: A comparative study.* *Journal of Protozoology.* 16:724. 1969.
- SCHUSTER F.L., DUNNEBAKE T.H. J. *Ultrastruct. Res.* 36:659. 1971. Citado por Diamond y col., 1976.
- SCHUSTER F.L., DUNNEBAKE T.H.: *Growth at 37°C of the EGs strain of the amoeboflagellate Naegleria gruberi containing virus-like particles. II. Cytoplasmic changes.* *J. Invertebr. Pathol.* 23:172. 1974.
- SCOTT M.T.: *The nature of immunity against Trypanosoma cruzi in mice recovered from acute infection.* *Parasite Immunol.* 3:209-218. 1981.
- SHARP P.A., SUGDEN B., SAMBROOK J.: *Detection of two restriction endonuclease activities in Haemophilus parainfluenzae using analytical agarose.* *Biochemistry* 12:3055. 1973.
- SJÖQUIST J., MORITZ J., JOHANSSON I-B.: *Localization of Protein A in the bacteria.* *Eur. J. Biochem.* 30:190-194. 1972.
- SMILEY B.L., ALINE R.F., MYLER P.J., STUART K.: *A retrotransposon in the 5' flank of a Trypanosoma brucei VSG gene lacks insertional terminal repeats.* *Mol. and Biochem. Parasitol.* 42:143-152. 1990.
- SNARY D.: *Cell surface glycoprotein of Trypanosoma cruzi: protective immunity in mice and antibody levels in human chagasic sera.* *Trans. R. Soc. Med. Hyg.* 77:126-129. 1983.

- SUN J., HERZER P.J., WEIRSTEIN M.P., LAMPSON B.C. INOUE M., INOUE S.: *Extensive diversity of branched-RNA-linked multicopy single-stranded DNAs in clinical strains of Escherichia coli*. Cell 56:701. 1989.
- SUTTON WD, GERLACH WL, SCHWARTZ D, PEACOCK WJ: *Molecular analysis of Ds controlling mutations at the Adhl locus of maize*. Science 223: 1265 - 1268. 1984.
- STERIN-BORDA L., COSSIO P.M., GIMENO M.F.: *Effect of chagasic sera on the rat isolated atrial preparation: immunological, morphological and functional aspects*. Cardiovas. Res. 10:613:622. 1976.
- SZARFMAN A., TERRANOVA V.P., RENNARD S.I.: *Antibodies to laminin in Chagas' disease*. J. Exp. Med. 155:1161-1171. 1982.
- TARR P.J., ALINE R.F., SMILEY B.L., SCHOLLER T., KEITHLY J., STUART K.: *LRI: A candidate RNA virus of Leishmania*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 85:9572-9575. 1983.
- TEMIN H.M. DAUGHERTY J.P., CELINOS C., HANNINK M.: *Reverse transcriptases. Retrons in bacteria*. Nature 339:254-255. 1989.
- TEMIN H.M. MIZUTANI.: *RNA dependent DNA polymerase in virions of Rous sarcoma virus*. Nature 226:1211. 1970. Citado por Heinz F.C., Kimball P.C., Levy J.A. Virology. Segunda edición. Prentice-Hall International. 1988.
- HERZAKIS J.A. Mii. Med. 134:916. 1969. Citado por Diamond y col., 1976.
- TEXEIRA A.R.L.: *Chagas' disease: trends in immunological research and prospects for immunoprophylaxis*. Bull. WHO. 57:697-710. 1979.
- TEXEIRA A.R.L., TEXEIRA G., MACEDO V., PRATA A.: *Trypanosoma cruzi sensitized T-lymphocyte mediates Cr51 release from human heart cells in Chagas' disease*. Am. J. Trop. Med. Hyg. 27:1097-1107. 1978.
- TRISCHMANN T.M.: *Non-antibody-mediated control of parasitemia in acute experimental Chagas' disease*. J. Immunol. 130:1953-1957. 1983.

UMEZAWA E.S., MILDER R.V., ABRAHAMSOHN I.A.: *Trypanosoma cruzi* amastigotes: development in vitro and infectivity in vivo of the forms isolated from spleen and liver. *Acta Tropica* 42:25-32. 1985.

VAN HOUTE A.J., SNIPPE H.: *Liposomes as carriers of immunogenic determinants*. En: *Liposomes Technology*. Gregoriadis C. ed. Boca Katon (Florida), CRC Press, 2:125-139. 1984.

VARMUS H.: *Retrotranscripción*. *Investigación y Ciencia*. Nov. 32 - 38. 1987.

VILLALTA F., KIERSZENBAUM F.: *Role of cell surface mannose residues in host cell invasion by Trypanosoma cruzi*. *Biochem. Biophys. Acta*. 736:39-44. 1983.

VILLALTA F., KIERSZENBAUM F.: *Host invasion by Trypanosoma cruzi: role of the cell surface galactose residues*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 119:228-235. 1984.

WALSH J.A.: *Estimating the burden of illness in the tropics*. In: *Tropical and Geographical Medicine*. Warren K.S. y Mahmoud A.A.F. eds. New York, McGraw-Hill, pp. 1073-1085. 1984.

WALTER R.D., SLUTZKY G.M., GREENBLATT C.L.: *Effect of leishmanial excreted factor on the activities of adenylate cyclase from hamster liver and Leishmania tropica: Tropenmed. Parasit.* 33:137-139. 1982.

WANG A., WANG C.C. *Molecular and Biochemical Parasitology*. 21:269-276. 1986 a. Citado por Widmer y col., 1989.

WANG A., WANG C.C.: *The double-stranded RNA in Trichomonas vaginalis may originate from virus-like particles*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 83:7956-7960. 1986 b.

WARREN L.G.: *Metabolism of Schizotrypanum cruzi. Effects of culture age and substrati concentration on respiratory rats*. *J. Parasitol.* 46:529-539. 1960.

WASHTIEN W.L., GRUMONT R., SANTI D.V.: *DNA amplification in antifolate - resistant Leishmania*. *The Journal of Biological Chemistry*. 260:

7809 - 7812. 1985.

WATSON J.D., HOPKINS N.H., ROBERTS J.W., ARGETSINGER STEIZ J., WEINER A.M.: *Molecular Biology of the gene*. Fourth Edition, The Benjamin/ Cummings Publishing Company, Inc. 1987.

WEINER A.M. A. Rev. Biochem. 55:631. 1986. Citado por Temim H.M. en: *Retrons in bacteria*. Nature 339:254-255. 1989.

WICKNER R.B.: *Killer systems in Saccharomyces cerevisiae*. En: *The Molecular Biology of the Yeast Saccharomyces, life, cycle and inheritance*, pp.415-444. J. Strathern, E.W. Jones and J.R. Broach, eds. 1981.

WIDMER G., COMEAU A.M., FURLONG D.B., WIRTH D.F., PATTERSON J.L.: *Characterization of a RNA virus from the parasite Leishmania*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 86:5979-5982. 1989.

WIRTH JJ, KIERSZENBAUM F: *Inhibitory action of elevated levels of adenosine - 3',5' cyclic monophosphate on phagocytosis: effects on macrophage - Trypanosoma cruzi interaction*. J. Immunol. 129: 2759 - 2762. 1982.

YAMAMOTO T., de CROMBRUGGHE B., PASTAN I.: *Identification of a functional promoter in the long terminal repeat of Rous sarcoma virus*. Cell 22:787-798. 1980.

YASUMARA Y., KAWAKITA Y. Nippon Rinsho 21:1209. 1963.

YEE T., INOUE M.: *Two-dimensional DNA electrophoretic methods utilizing in situ enzyme digestions*. Cell 38:203. 1984.

ZINGALES B, KATZIN MV, COLLI W: *Correlation of Tunicamycin - sensitive surface glycoproteins from Trypanosoma cruzi with parasite interiorization into mammalian cells*. Mol. Biochem. Parasitol. 16 : 21- 34. 1985.

ZINKERNAGEL R.M., DOHERTY P.C.: *Immunological surveillance against altered self components by sensitised T lymphocytes in lymphocytic choriomeningitis*. Nature 251:547. 1974.

ZINKE, NAGEL R.M., ALTHAGE A., BLANDEN R.V., DAVISON W.F.,  
DUNLOP M.B.C., SHEREFFLER D.C.: *H 2 restriction of cell mediated  
immunity to and intracellular bacterim.* J. Exp. Med. 145:1353. 1977.