

UNIVERSIDAD DE GRANADA FACULTAD DE FARMACIA

ESTUDIOS FISIOLÓGICOS Y BIOQUÍMICOS  
DE "TRYPANOSOMA CRUZI"

FCO. JAVIER ADROHER AUROUX

TD-EP. 14.804

576.89(043) ADR.

H-4  
4  
16

UNIVERSIDAD DE GRANADA  
FACULTAD DE FARMACIA  
DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGIA

UNIVERSIDAD DE GRANADA  
FACULTAD DE FARMACIA  
- 4 JUN. 1985  
REGISTRO DE ENTRADA  
N.º 5.090

ESTUDIOS FISIOLÓGICOS Y BIOQUÍMICOS  
DE Trypanosoma cruzi

MEMORIA QUE, PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR EN  
FARMACIA, PRESENTA EL LICENCIADO  
FCO. JAVIER ADROHER AUROUX

BIBLIOTECA UNIVERSITARIA  
GRANADA  
N.º DOCUMENTO 61369991x  
N.º COPIA 215810604

UNIVERSIDAD DE GRANADA

FACULTAD DE FARMACIA

ESTUDIOS FISIOLÓGICOS Y BIOQUÍMICOS

DE Trypanosoma cruzi

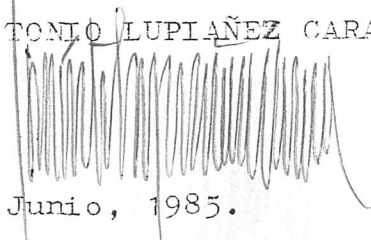
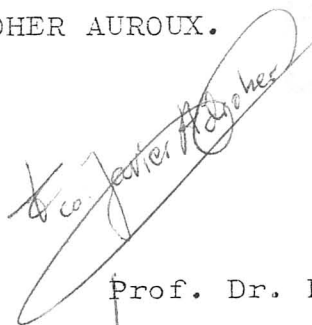
Tesis presentada para optar al  
Grado de Doctor en Farmacia,  
por el Licenciado FCO. JAVIER  
ADROHER AUROUX.

Directores:

Prof. Dr. D. ANTONIO OSUNA  
CARRILLO DE ALBORNOZ



Prof. Dr. D. JOSE AN-  
TONIO LUPIAÑEZ CARA



Granada, Junio, 1985.

Los trabajos de investigación que se exponen en la presente Memoria titulada: "ESTUDIOS FISIOLÓGICOS Y BIOQUÍMICOS DE Trypanosoma cruzi", han sido realizados en los laboratorios del Departamento Interfacultativo de Parasitología y del Departamento Interfacultativo de Bioquímica de la Universidad de Granada, bajo la dirección de los Profesores Doctores D. Antonio Osuna Carrillo de Albornoz y D. José Antonio Lupiáñez Cara, de los respectivos Departamentos.

Granada, Junio 1985.



A mis padres

A Rocío

estudio por medio de los datos  
de Alvarado y de la encuesta  
del presente estudio la creación

La realización de este trabajo  
ha sido posible gracias a las be-  
cas de I.N.A.P.E. y de P.F.P.I.,  
así como por la subvención de la  
C.A.I.C.Y.T. al proyecto.

Agradezco profundamente a los doctores Antonio Osuna Carrillo de Albornoz y José Antonio Lupiáñez Cara, directores del presente trabajo, la orientación prestada, así como el entusiasmo, interés y dedicación con que han seguido la realización de esta Tesis Doctoral.

A los profesores Dr. José González Castro, Director del Departamento de Parasitología, y Dra. M. Carmen Mascaró Lazcano, por el apoyo e interés mostrado, así como por las facilidades dadas para la realización de este trabajo.

A Rocío Benítez, por su cariñosa e inestimable ayuda, apoyo y paciencia que, de principio a fin y con el esfuerzo diario, ha permitido que este trabajo y su realizador lleguen a buen fin.

A los compañeros y amigos Santiago Castanys, Paco Gamarro y Luís Miguel Ruiz-Pérez, por el continuo estímulo y colaboración que me han prestado.

A Gracia Ortega y Dora Jiménez, por su amistad, enseñanzas, ayuda y entusiasmo que me mostraron desde el primer momento.

A Amparo, Susana, Ana, Isa, Beatriz, Manolo, Mara, M<sup>a</sup> Nieves, Paco O'Vaile y Elisa, por su amistad.

Al resto de compañeros y amigos del Departamento.

Al profesor Dr. Eduardo García Peregrín, que me ha concedido las máximas facilidades para la utilización de los medios del Departamento de Bioquímica, del cual es Director, así como a Alberto Vargas, José Luis Periago y Luis Sánchez de Medina, por su colaboración.

Al Dr. Bartolomé Quintero del Departamento de Fisico-Química, al Dr. Manuel Miró del Departamento de Farmacognosia y Farmacodinamia, al Ldo. José Domínguez del Departamento de Química Orgánica y al Departamento de Microbiología de la Facultad de Farmacia.

Al Dr. Francisco Revelles del Departamento de Histología y al Dr. Antonio Cueto del Departamento de Microbiología de la Facultad de Medicina.

Al Dr. José Juan Quesada del Departamento de Estadística y al Centro de Informática de la Universidad de Granada. Al Departamento de Mineralogía y Cristalografía de la Estación Experimental de Zaidín y a la Biblioteca del Instituto López-Neyra.

A Francisco Lorenzo, por la labor en la sección gráfica de este trabajo.



Algunos de los resultados expuestos en la presente memoria han sido presentados a la III CONFERENCIA MEDITERRANEA DE PARASITOLOGIA, 1981; al X CONGRESO DE LA SEB, 1982; al III CONGRESO NACIONAL DE PARASITOLOGIA, 1983; y al IV EUROPEAN MULTICOLLOQUIUM OF PARASITOLOGY, 1984.

## INDICE

	<u>Pág.</u>
1.- <u>INTRODUCCION</u> .....	2
2.- <u>ANTECEDENTES</u>	
2.1.- Metaciclologénesis de <u>T. cruzi</u> .....	6
2.2.- Producción de $\text{NH}_4^+$ por <u>T. cruzi</u> .....	38
2.2.1.- Formación de cristales por micro- organismos .....	41
2.3.- Metabolismo glucídico de <u>T. cruzi</u> .....	44
3.- <u>MATERIAL Y METODOS</u>	
3.1.- Material biológico utilizado	
3.1.1.- El parásito: <u>Trypanosoma cruzi</u> .....	67
3.1.1.1.- Mantenimiento del parásito en nuestro laboratorio .....	83
3.1.2.- El vector: <u>Rhodnius prolixus</u> .....	87
3.1.3.- Células Vero .....	89
3.1.3.1.- Mantenimiento de células Vero en nuestro laboratorio .....	89
3.2.- Cultivo in vitro de <u>T. cruzi</u>	
3.2.1.- Obtención de formas epimastigotas de cultivo .....	92

## II

	<u>Pág.</u>
3.2.2.- Obtención de formas metacíclicas de cultivo .....	93
3.2.3.- Obtención de formas amastigotas de cultivo de células Vero .....	95
3.2.4.- Preparación de medios de cultivo Grace modificados .....	97
3.2.4.1.- Análisis de los resultados .....	104
3.3.- Estudio de las posibles modifica- ciones inducidas en el medio Grace .....	105
3.3.1.- Estudio de las modificaciones en azúcares .....	107
3.3.2.- Estudio de las modificaciones en aminoácidos .....	108
3.4.- Soluciones y medios empleados .....	110
3.5.- Preparación del extracto de <u>Rhodnius prolixus</u> .....	116
3.6.- Determinación de tiaminasa	
3.6.1.- Determinación espectrofotométrica de Tiaminasa I .....	117
3.6.2.- Determinación espectrofluorométrica de tiamina .....	119

### III

	<u>Pág.</u>
3.7.- Determinación de amonio en amastigotes .....	122
3.8.- Determinación de la naturaleza de los cristales aparecidos en los medios de cultivo .....	125
3.9.- Determinación de glucosa .....	129
3.10.- Producción de $^{14}\text{CO}_2$ a partir de D-(U- $^{14}\text{C}$ )-glucosa .....	131
3.11.- Preparación de extractos de <u>Trypano-</u> <u>soma cruzi</u> .....	134
3.12.- Determinación de proteínas .....	135
3.13.- Determinaciones enzimáticas .....	137
3.13.1.- Hexokinasa .....	139
3.13.2.- Fosfofructokinasa .....	139
3.13.3.- Fructosa-1,6-bisfosfatasa .....	140
3.13.4.- Piruvato kinasa .....	141
3.13.5.- Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa ....	142
3.13.6.- Citrato sintasa .....	142
3.13.7.- Isocitrato deshidrogenasa NADP y NAD dependientes .....	143
3.13.8.- Succinato deshidrogenasa .....	144

IV

	<u>Pág.</u>
3.13.9.- Cálculo de la actividad espe- cífica .....	145
3.13.10.- Cálculo de la constante de Michaelis y de la velocidad máxima .....	146
3.14.- Observaciones generales .....	147
4.- <u>RESULTADOS</u>	
4.1.- Crecimiento y transformación de <u>Trypa-</u> <u>nosoma cruzi</u> en medios de cultivo Grace modificados .....	151
4.2.- Estudio de las posibles modificaciones inducidas en el medio Grace (1962) .....	200
4.2.1.- Estudio de las modificaciones en azúcares .....	200
4.2.2.- Estudio de las modificaciones en aminoácidos .....	203
4.3.- Determinación de Tiamina y Tiaminasa ...	207
4.3.1.- Detección espectrofotométrica de Tiaminasa I .....	208
4.3.2.- Determinación espectrofluorométrica de tiamina .....	209

	<u>Pág.</u>
4.4.- Determinación de amonio en amastigotes .....	210
4.5.- Determinación de la naturaleza de los cristales aparecidos en los medios de cultivo .....	211
4.6.- Producción de $^{14}\text{CO}_2$ a partir de D-( $\psi$ - $^{14}\text{C}$ )-glucosa .....	218
4.6.1.- Producción de $^{14}\text{CO}_2$ por formas epi- mastigotas y metacíclicas de <u>T. cruzi</u> .....	218
4.6.2.- Evolución de la producción de $^{14}\text{CO}_2$ en un cultivo de epimastigotes de <u>T. cruzi</u> .....	219
4.7.- Determinaciones enzimáticas	
4.7.1.- Hexokinasa .....	224
4.7.2.- Fosfofructokinasa .....	228
4.7.3.- Fructosa-1,6-bisfosfatasa .....	232
4.7.4.- Piruvato kinasa .....	237
4.7.5.- Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa .....	240
4.7.6.- Citrato sintasa .....	244
4.7.7.- Isocitrato deshidrogenasa NADP y NAD dependientes.....	252

VI

	<u>Pág.</u>
4.7.8.- Succinato deshidrogenasa .....	256
5.- <u>DISCUSION</u>	
5.1.- Metaciclologénesis de <u>T. cruzi</u> .....	263
5.2.- Producción de $\text{NH}_4^+$ por <u>T. cruzi</u> .....	309
5.3.- Metabolismo glucídico de <u>T. cruzi</u> .....	314
6.- <u>CONCLUSIONES</u> .....	352
7.- <u>BIBLIOGRAFIA</u> .....	360

0. APLICACIONES DE LA INGENIERIA

1.- I N T R O D U C C I O N



La tripanosomiasis americana o enfermedad de Chagas constituye la más típica enfermedad endémica del continente americano, en la que las tasas de mortalidad y, sobre todo, de morbilidad son elevadas, contribuyendo de una manera notable, en opinión del World Bank, al subdesarrollo económico y social de los países afectados.

El agente etiológico de dicha enfermedad es Trypanosoma cruzi, protozoo parásito que, de una manera natural, se transmite a través de un insecto vector. Sin embargo, también son posibles otras vías de transmisión como la transplacentaria, la sexual y, mediante técnicas médicas, la transfusión o la hemodiálisis. De hecho, en áreas urbanas, los nuevos casos de transmisión por estas vías están en progresivo aumento, al igual que la enfermedad en sí.

En un reciente informe de unos investigadores brasileños (SCHLEMPER y col., 1983) se indica que el 57%

de la población rural del estado de Santa Catarina (Brasil) presenta positividad serológica a dicha enfermedad, mientras que tan sólo hace 15 años era del 39%. Este hecho contrasta con los datos existentes para otras enfermedades víricas, como la polio, o incluso parasitarias, como las leishmaniasis o helmintiasis intestinales, en las que las tasas de positividad se mantienen, en el primer caso, o disminuyen paulatinamente, en el segundo.

Esto se debe en gran parte a que no existe para Trypanosoma cruzi una quimioterapia eficaz ni unas medidas inmunoprolifácticas.

Una serie de puntos de la biología de este parásito permanecen aún muy oscuros. Fundamentalmente, las diferencias entre las formas infectantes, las no infectantes y las intracelulares. Su metabolismo, los cambios metabólicos en las diferenciaciones de unos a otros o las condiciones fisiológicas necesarias para estas transformaciones, son aspectos muy poco conocidos de este hemoflagelado.

En la presente memoria de Tesis Doctoral, hemos pretendido estudiar algunos aspectos de la fisiología de la metaciclologénesis y del metabolismo glucídico de las formas metatripomastigotas infectivas comparándolas

lo con el de las formas epimastigotas no infectivas, al objeto de buscar diferencias que pudieran utilizarse en un futuro para el diseño de estrategias de lucha frente a este protozoo parásito.

2.- A N T E C E D E N T E S

## 2.1.- METACICLOGENESIS DE Trypanosoma cruzi.

Los cultivos "in vitro" de protozoos parásitos se iniciaron en el año 1903 por NOVY y Mac NEAL al cultivar Trypanosoma lewisi, parásito de rata, en el agua condensada sobre una base sólida constituida por agar nutritivo y sangre de conejo. Al aumentar la proporción de ésta en la base sólida, Mac NEAL, en 1904, consiguió cultivar Trypanosoma brucei de la misma manera. Poco después, NICOLLE (1908) simplificó el medio de NOVY y Mac NEAL, cultivando Leishmania tropica en el mismo, el cual se ha dado en llamar medio NNN (NOVY, Mac NEAL y NICOLLE).

Este medio es el fundamento de todos los medios bifásicos que se han desarrollado posteriormente y aún ampliamente utilizados en los que se emplean como fase líquida distintas soluciones: cloruro sódico al 8,3%, Ringer, Locke, Hanks, MEM + 20% de SBFI, BHI, ...

Junto con los medios bifásicos se han desarrollado diversos medios monofásicos más o menos definidos, tendiéndose siempre, por una parte, a la máxima definición del medio para estudios nutricionales, fisiológicos y bio-

químicos y por otra, al mayor rendimiento de material biológico posible para estudios inmunológicos y bioquímicos.

Los primeros medios monofásicos fueron descritos por WENYON (1921) y NOGUCHI y LINDENBERG (1925) en los que cultivaron Leishmania spp. y Trypanosoma cruzi. Estos medios contenían agar nutritivo al 2% con solución salina y sangre. En años posteriores, se describieron modificaciones de estos medios destinadas al cultivo exclusivo de T. cruzi (KELSER, 1936; SILVA, 1954) comprobándose que la sangre total podía ser sustituida por suero, hemina y ácido ascórbico (LWOFF, 1938).

Distintos medios líquidos se han desarrollado desde entonces como son los de CITRI (1954) y CITRI y GROSSOWITZ (1955) en los que la sangre es remplazada por hemina, albúmina de suero cristalizada y una serie de factores de crecimiento, entre los que se encuentran diversas vitaminas, ácido ribonucleico y guanosina; el de BONE y PARENT (1963) en el que utilizan estearato sódico, tiamina y ácido fólico; el medio LIT de CAMARGO (1964); el de WARREN (1960); el de YOSHIDA (1975); el de AZEVEDO y ROITMAN (1977); o el medio definido de AVILA y col. (1979a) el cual contiene catalasa de hígado bovino, peroxidasa de rá

bano picante, lactoperoxidasa y hemoglobina bovina como únicas macromoléculas.

Todos los medios hasta ahora comentados sólo permiten el desarrollo de las formas epimastigotas del parásito, aunque en algunos de ellos aparecen algunas formas metacíclicas al finalizar la fase exponencial de crecimiento, sobre todo en el medio LIT (CAMARGO, 1964).

PAN (1971) desarrolló un sistema de cultivo axénico de formas amastigotas de T. cruzi en ausencia de células del hospedador. Partía de formas epimastigotas cultivadas en dos medios líquidos (F-29 y F-32) a 35,5°C, obteniendo un 94% de amastigotes tras varios subcultivos. Es interesante indicar que en el primer pase a través del medio F-32, a 35,5°C, obtuvo un 90% de tripomastigotes sanguíneos que en pases sucesivos se diferenciaron a amastigotes. Está por demostrar que tanto unos como otros se identifiquen exactamente con las formas amastigotas intracelulares y tripomastigotas sanguíneas del hospedador vertebrado.

STOHLMAN y col. (1973) obtienen tripomastigotes sanguíneos por inoculación de epimastigotes de cultivo en

frascos conteniendo monocapas de células Vero en cultivo e incubando a 33°C. Esto induce la invasión de los tejidos y la formación de amastigotes intracelulares. Después de un periodo variable empiezan a aparecer tripomastigotes sanguíneos, que tras varios cambios del medio de cultivo usado por medio fresco, alcanzan una proporción del 90-95%.

En esta revisión bibliográfica nos centraremos fundamentalmente en los medios desarrollados para la obtención de formas metacíclicas de Trypanosoma cruzi, así como en los posibles factores que influyen en la metaciclogénesis (transformación o diferenciación de las formas epimastigotas en metacíclicas).

Hasta ahora, no se ha encontrado un medio adecuado para obtener, de forma regular y permanente, metatripomastigotes de T. cruzi. Es necesario aún un conocimiento mayor de los nutrientes requeridos por este parásito y de las condiciones físico-químicas y fisiológicas relacionadas o involucradas en la transformación, así como de las contribuciones particulares del hospedador para alcanzar esta meta.



En esta línea, STEINERT (1958) dió un paso importante al determinar que la urea presente en el suero de sapo es responsable, en gran medida, de la transformación de las formas de cultivo de Trypanosoma mega, parásito del sapo, en formas tripomastigotas sanguíneas; aparentemente hay factores físico-químicos que aumentan el efecto de la urea en esta transformación.

En T. cruzi, los primeros trabajos sobre las formas metacíclicas que merecen mención son los de CAMARGO (1964) y SILVA y CAMARGO (1964). En el primero se sugiere que bien el agotamiento de los factores del medio o bien el pool interno de los epimastigotes son indispensables para la metaciclogénesis, mientras que en el segundo, se hace hincapié en que todas las transformaciones que tienen lugar a lo largo del ciclo de vida de los tripanosomas, podrían deberse a un sistema "operón", como el descrito por JACOB y MONOD para los procariotas, iniciándose cuando hay cambios en el entorno del parásito. Así pues, estos autores sugieren que la diferenciación de tripomastigotes a amastigotes se podría deber a la presencia de proteínas intracelulares, mientras que la transformación inversa, se vería influenciada por los cambios sufridos en el me-

dio intracelular de la célula hospedadora.

Ya se había observado desde hacía tiempo que la diferenciación en cultivo de formas epimastigotas a metatripomastigotas tenía lugar al finalizar la fase de crecimiento exponencial. Este hecho coincide con una bajada del pH del medio que, seguidamente, comienza a subir, probablemente debido a un acúmulo de ácidos orgánicos que posteriormente son metabolizados por T. cruzi. Controlando el pH inicial del medio, FERNANDES y col. (1969), fueron capaces de estimular o reprimir la transformación sin variar sensiblemente el crecimiento. También comprueban que los tripanosomas sujetos a la diferenciación presentan una curva de incorporación de timidina, uridina y leucina tritizadas, paralela a la metaciclogénesis, indicando una nueva síntesis de proteínas, RNA y DNA. Observan que las tasas de síntesis de DNA en el núcleo y en el kinetoplasto son similares.

En 1966, BAKER cultiva Trypanosoma avium en medio NNN y 4N a 28°C, desarrollándose en ambas formas metacíclicas infectivas, siendo éstas más numerosas en el medio 4N, aunque en uno y otro caso el rango de transforma-

ción es muy variable. Estas formas no se obtenían en cultivos realizados a 40-41°C, por lo que el autor sugiere una influencia de la temperatura como uno de los factores que pueden estar envueltos en la metacicloogénesis.

CASTELLANI y col. (1967) al trabajar con los medios LIT y HIL a distintos pH, añaden otra serie de factores posibles que pueden intervenir en la metacicloogénesis como son: el pH, la preincubación a ciertos niveles de temperatura durante un tiempo determinado (probablemente debido a una sincronización de los parásitos), el tamaño del inóculo y la edad del cultivo.

Hasta ese momento, los medios utilizados no permitían, excepto ocasionalmente, obtener porcentajes superiores al 60% de formas infectivas de Trypanosoma cruzi con relativa regularidad. Pero al dirigir las investigaciones hacia medios ideados para cultivos de células de insectos, WOOD y PIPKIN (1969) consiguieron superar este porcentaje.

Así, el empleo de medio de GRACE (1962) enriquecido con un 10% de SBFI y adicionado con hemolinfa de un insecto lepidóptero, Philosamia cynthia, a distintas concentraciones, les permitió obtener hasta un 90% de

formas metacíclicas a partir de tripomastigotes sanguíneos mantenidos a 28°C en dicho medio con un 1% de hemolinfa. WOOD y PIPKIN concluyen que en el suero o en la hemolinfa deben existir uno o varios factores que influyen en la multiplicación y diferenciación de T. cruzi, ya que también observan que ésta se hace casi inapreciable a un 20% de SBFI.

Posteriormente, WOOD y SOUSA (1976) realizaron experiencias similares con extractos salinos de adultos de Rhodnius prolixus, obteniéndose un 85% de formas metacíclicas cuando la concentración del extracto en el medio fue de 0,25%.

Estos trabajos fueron continuados por CHIARI y CARNEIRO (1978a) en los que utilizando medio HIL sin infusión de corazón de perro, le adicionaron extractos de hemipteros (géneros Zelus, Panstrongylus, Triatoma, Rhodnius y Dipetalogaster) observando que todos estimulaban la metaciclogénesis, siendo máxima en el caso de Dipetalogaster. Sugieren que no sólo hemípteros y lepidópteros, sino otros órdenes de insectos contendrán un factor estimulador de esta diferenciación.

CHIARI (1974) demuestra que cultivos de dos cepas, Y y MR, de T. cruzi, aisladas del hospedador vertebrado y mantenidas en medio LIT durante diferentes periodos de tiempo, presentan curvas de crecimiento similares. Sin embargo, la proporción de metaciclogénesis fue distinta en los cultivos de ambas cepas, siendo mayor en la cepa MR.

Este mismo autor (1976) posteriormente llega a la conclusión de que repetidos pases de T. cruzi a través de vertebrados y hemocultivos modifican la diferenciación de las formas de cultivo en medio LIT, presentando una proporción de metacíclicos cinco veces mayor que el cultivo original.

Considera que el crecimiento y diferenciación de T. cruzi depende de una serie de variables, tales como temperatura, nivel de pH, factores o elementos presentes en los componentes complejos como en el caso de la trip-tosa, la infusión de hígado o en el suero bovino.

Además, piensa que el porcentaje de metaciclogénesis depende de la cepa del protozoo por lo que opina que dicho porcentaje podría utilizarse como método de identificación de cepas, pero quizás sería necesario para ello un medio químicamente definido (CHIARI, 1976).

ALVARENGA y col. (1976) observaron, tanto en el insecto vector como "in vitro", que el máximo número de formas metacíclicas se desarrolla entre 26 y 28°C, disminuyendo grandemente el número al alejarse de estos valores (ensayaron temperaturas entre 20 y 34°C).

Las formas de cultivo de Trypanosoma cruzi agotan la glucosa del medio de cultivo, teniendo lugar a continuación la oxidación de los ácidos orgánicos que se acumulan en el medio como resultado de ese catabolismo. Una disminución del pH del medio HIL, pH inicial 6,7, corre paralela con la desaparición de la glucosa. El consumo de los ácidos, medido a través de las alteraciones de pH, guarda una estrecha relación con la tasa de metaciclogénesis. Cuando se adiciona glucosa diariamente al medio de cultivo para mantener la concentración inicial, la diferenciación se inhibe, existiendo una progresiva bajada del pH del medio hasta alcanzar un nivel tóxico disminuyendo el nivel de crecimiento. Los ácidos que se acumulan son succínico y málico que son progresivamente consumidos en la fase estacionaria de crecimiento (CACERES y FERNANDES, 1976).

La glucólisis anaerobia disminuye con la edad

del cultivo, siendo más elevada en flagelados del medio HIL a pH 6,7 que a pH 7,2. Tanto el crecimiento como la diferenciación son inhibidos por anaerobiosis en cultivos en medio HIL pH 6,7. La oxidación de la glucosa a través de la vía de las pentosas-fosfato es mucho más elevada que la realizada por el ciclo de Krebs, que opera a velocidad limitada. El fluoruro estimula la oxidación de la glucosa, mientras que la azida la inhibe. El consumo de oxígeno alcanza un valor mayor al final de la fase exponencial de crecimiento (CACERES y FERNANDES, 1976).

Se ha observado el efecto de diversas fracciones del suero bovino fetal, así como de proteínas parcialmente purificadas del mismo y mezclas de ambas, obtenidas por cromatografía en columna de intercambio iónico, en la metaciclogénesis "in vitro" de T. cruzi en medio de cultivo SM de O'DALY (1975) carente de SBF. Además de promover la división celular, la mayoría de las fracciones estimularon la incorporación de timidina tritiada por los parásitos. Estas fracciones son alteradas durante la fase de crecimiento logarítmico de los flagelados (O'DALY, 1976).

ALVARENGA y BRENER (1978) trabajando con las primeras etapas ninfales de Triatoma infestans y Dipetaloc-

gaster maximus, vectores de T. cruzi, demuestran que el desarrollo del parásito en el hospedador invertebrado no requiere sangre, pero sí puede necesitar factores desconocidos secretados y/o excretados en el tracto digestivo del insecto. Obtienen metatripomastigotes infectivos para hospedadores vertebrados.

ZELEDON y col. (1977) estudiaron la eliminación de T. cruzi en la orina de D. maximus y T. infestans, insectos vectores, observando que la máxima excreción de metatripomastigotes siempre ocurría entre la primera y quinta gota de orina después de las comidas, aunque el número real variaba considerablemente de un ejemplar a otro.

Posteriormente sembraron epimastigotes obtenidos de cultivo en distintos tubos conteniendo solución salina tamponada y glucosada (como control) a la que se adicionó orina o heces de los redúvidos, urato o hematina. En el control, los flagelados sólo vivieron unos 5 días mientras que en los tubos con orina o heces vivieron 11-13 días, apareciendo metacicloogénesis. En los medios con urato los metacíclicos aparecieron en proporciones inferiores y la supervivencia fue también menor (7-9 días). En los tubos con hematina y con sólo glucosa, el porcentaje de trans-



formación fue muy bajo, así como la supervivencia (3-7 días).

Estos autores también realizaron estudios histológicos que mostraron a los flagelados adheridos al epitelio de la glándula rectal y al saco rectal del intestino de los dos vectores estudiados.

Por otra parte, CHIARI y CARNEIRO (1978b) determinaron la acción de diversos factores en la diferenciación de T. cruzi adicionando un 20% de infusión de corazón de perro, buey, cerdo, conejo, caballo y cabra, a los medios LIT y HIL, pH inicial 6,7, sin infusión de hígado, añadiendo en el control PBS al 20%. Los resultados fueron similares en todos los casos, pero cuando la proporción de PBS era del 40%, aumentó la transformación hasta un 80-90%, indicando los autores que ésto podría deberse a la baja proporción de nutrientes en el medio, quizás necesaria para la metaciclogénesis.

KIMURA y col. (1978) trabajando con formas metacíclicas, purificadas por la adición de suero fresco de rata que lisa las formas epimastigotas pero no las metatripomastigotas, siguen su evolución extracelular "in vitro" en medio LIT a 27°C donde se transformaron en amasti

gotes que se dividieron activamente, pasando seguidamente a epimastigotes. En ciertas cepas o bajo ciertas condiciones los amastigotes daban lugar a tripomastigotes "stout" y "slender". Si la temperatura de incubación era de 37°C aparecían amastigotes sin posterior evolución. Concluyen que, al menos aparentemente, los metatripomastigotes no dependen exclusivamente de las condiciones intracelulares para su posterior desarrollo y multiplicación.

Los resultados obtenidos por SOUZA y SOUTO-PADRON (1978) al estudiar el kinetoplasto de Trypanosoma cruzi revelan cambios profundos en éste durante el proceso de transformación de esferomastigote (amastigote)- epimastigote- tripomastigote. Piensan que durante esta evolución hay formación de nuevas proteínas o, quizás, mayor captación de amino-ácidos básicos, como consecuencia de la modificación del DNA del kinetoplasto.

En este sentido, recientemente, ASTOLFI FILHO y col. (1984) encontraron que las formas metacíclicas de T. cruzi sintetizan al menos tres proteínas diferentes a las sintetizadas por los epimastigotes. Dichas proteínas presentan pesos moleculares de 73000, 64000 y 55000 daltons.

Por primera vez, en 1979, se estudia el compor-

tamiento de T. cruzi cultivado en presencia de células de su hospedador invertabrado. Así, LANAR (1979) inoculó tripomastigotes sanguíneos en un cultivo de células de embrión de Triatoma infestans (TI-32) los cuales se diferenciaron a estafilomastigotes que posteriormente dieron lugar a metatripomastigotes y a algunos epimastigotes (2%). En ausencia de las células TI-32 se produce la primera diferenciación pero no la segunda. Ello le sugiere la presencia de uno o varios factores lábiles excretados por las células que permiten la segunda diferenciación y el mantenimiento de los tripomastigotes metacíclicos obtenidos. No observa influencias del pH.

En nuestro laboratorio, OSUNA y col. (1979) utilizaron medio Grace, suplementado con 10% de SBFI, modificándolo por bajada del pH a 1,5 y posterior ajuste a 5,8 e inoculando tripomastigotes sanguíneos de T. cruzi obtuvieron hasta un 93% de formas metacíclicas al noveno día de cultivo.

DUSANIC (1980) sembró epimastigotes de T. cruzi en medio LMC, compuesto de una parte de medio SM, tres partes de medio ML-15 y 5% de SBF, obteniendo del 89 al 95% de formas metacíclicas.

GARCIA y GILLIAM (1980) demostraron que el desarrollo de T. cruzi en el intestino de Rhodnius prolixus es independiente de la digestión proteica en el mismo.

BRUN y SCHÖNENBERGER (1981) consiguieron estimular la transformación de las formas sanguíneas de Trypanosoma brucei a formas procíclicas "in vitro", por adición de citrato y/o cis-aconitato al medio de cultivo, obteniendo los mejores resultados con 3 mM del segundo durante 48 horas. Estos autores sugieren una activación de la isocitrato deshidrogenasa y/o otros enzimas del ciclo de Krebs, actuando como un disparador metabólico para los cambios morfológicos incluidos en la transformación.

Siguiendo la línea de los trabajos de WOOD, De ISOLA y col. (1981) probaron la influencia de los extractos de órganos de Triatoma infestans en la diferenciación de Trypanosoma cruzi. Cuando usaban extractos de intestino o estómago obtenidos de triatomas alimentados 24-48 horas antes para suplementar medio Grace modificado, se indujo el crecimiento y la diferenciación a formas metacíclicas en un alto porcentaje de la población. La fuente de alimento de los insectos pareció ser importante para la diferenciación. Estos estudios sugieren la importancia

de factores del insecto vector en la metaciclologénesis.

Este medio Grace suplementado con homogenado de intestino de Triatoma infestans (GMTIIH) condujo a una transformación del 60-90% de las formas epimastigotas en metacíclicas, pero no permitió más de 3 ó 4 resiembras. Al adicionar a este medio 20 mg de hemina/l y 50 mg de ATP/l, la diferenciación fue del 60-70% y hasta el momento de la publicación de sus resultados habían conseguido subcultivar en 25 ocasiones (De.ISOLA y col., 1983).

La interacción de los epimastigotes de Trypanosoma cruzi con el homogenado de intestino de Triatoma infestans durante 15 minutos, fue suficiente para provocar cambios morfológicos a los 6-8 días de ser transferidos a medio Grace sin homogenado de intestino. Si la interacción se producía después de una preincubación de los epimastigotes en PBS-1% albúmina durante 30 minutos, los cambios morfológicos en el medio Grace se detectaban a los 4 días. El hecho de que los epimastigotes de T. cruzi, después de 15 minutos de interacción con el homogenado de intestino, no desarrollen cambios morfogenéticos al ser transferidos a medios como el LIT, Warren, TC 199 o a medios bifásicos, prueba que el medio Grace es esencial para asegurar la me

taciclogénesis. Los cambios morfológicos no se daban si el homogenado de intestino era preincubado con epimastigotes de T. cruzi o promastigotes de Leishmania mexicana y seguidamente era adicionado al medio Grace, el cual era inoculado con epimastigotes que no habían estado en contacto con el homogenado. Estos cambios sólo se daban parcialmente si la preincubación se hacía con eritrocitos de oveja (De ISOLA y col., 1984).

LOPETEGUI y SOSA-MIATELLO (1982) estudiaron la diferenciación de T. cruzi a 37°C en solución de Hanks a la que añaden suero de bovino inactivado (6%) y lactoalbúmina hidrolizada (0,25-1%), obteniendo un 40% de transformación sin crecimiento exponencial y sin descenso del pH del medio. Al adicionar infusión de hígado de buey (2-3g% de tejido fresco esterilizado) se produjo un crecimiento exponencial con una diferenciación no superior al 5% en la fase estacionaria y descenso del pH del medio hasta 5,5 (pH inicial 7,35). Los resultados obtenidos indican que el agotamiento de algún o algunos factores nutritivos del medio influyen en la metaciclogénesis, como ya habían indicado CHIARI y CARNEIRO (1978b), y que el suero ha resultado ser un factor estimulante esencial para la diferenciación en las condiciones experimentales usadas.

Recientemente, CONTRERAS y col. (1985) obtienen una diferenciación del 80-90% en una solución salina tamponada que trata de imitar la composición de la orina de triatómidos a la que adicionan un 10% de suero bovino de recién nacido (medio TAUS). Esto parece abalar la hipótesis de CHIARI y CARNEIRO (1978b) de que la baja proporción de nutrientes estimularía la diferenciación.

HUNTER y col. (1982) cultivaron promastigotes de Leishmania mexicana en medio de cultivo de células de mamíferos con 10% de suero a 26°C, creciendo exponencialmente. Al elevar la temperatura de incubación a 34°C se transformaron en formas amastigotas en un 95%. Si de nuevo se incubaban a 26°C volvían a la forma promastigota.

En un nuevo intento por conseguir porcentajes de metaciclogénesis elevados y constantes, SULLIVAN (1982) sembró medio Grace suplementado con 10% de SBF (pH 6,6) con formas epimastigotas procedentes del medio LIT de Yaeger, obteniendo un 90% de formas metacíclicas. La disminución o eliminación del porcentaje de suero afecta negativamente al crecimiento pero no decrece los niveles de diferenciación.

CRANE y DVORAK (1982) informaron del aislamiento

to de una variante de T. cruzi, cepa Y, que exhibía un alto porcentaje de diferenciación (90%) cultivada en medio LIT a 26°C.

SHER y SNARY (1982) describieron la inhibición de la transformación de epimastigotes a tripomastigotes "in vitro" por un anticuerpo monoclonal específico para glicoproteínas de superficie de T. cruzi de peso molecular 72000, proponiendo que esta molécula puede ser un receptor que controle la diferenciación en el vector, regulando así la multiplicación y acumulación de epimastigotes en el intestino del redúvido. Sugieren que este receptor pudiera ser una lectina.

COX (1982) opina que esta <sup>parte</sup> lectina, además de acumular epimastigotes en el intestino medio del vector el tiempo necesario para que una gran proporción pueda transformarse a metacíclicos y así asegurar la infección de un nuevo hospedador, retendrá un número de epimastigotes no transformados para posteriores diferenciaciones e infecciones.

Posteriormente, SHER y col. (1983) implantaron cámaras de difusión subcutáneamente en ratones para estudiar la diferenciación. Utilizando epimastigotes de T. cru-



zi, la transformación fue evidente a las 16 horas post-implantación, alcanzando su máximo a las 24 horas con un 92% de tripomastigotes. Poco antes de la transformación se vió que los epimastigotes desarrollaban resistencia a la lisis por la vía alternativa al complemento. Además, la implantación de parásitos en fase estacionaria daba lugar a la acumulación de gran número de epimastigotes, resistentes al complemento, en las cámaras. Los autores sugieren que los epimastigotes pasan a través de una fase de transición en la que son resistentes al complemento antes de pasar a tripomastigotes y que la transformación puede requerir una división celular. En otros experimentos observaron que los epimastigotes recuperados tras 7 horas en las cámaras implantadas en los ratones se diferenciaron a tripomastigotes al ser cultivados a 37°C durante 17 horas. Esto indica que el iniciador de la transformación morfológica de epimastigotes a tripomastigotes puede estar disociado del proceso de diferenciación en sí mismo.

UCROS y col. (1983) estudiaron la metaciclogénesis de Trypanosoma cruzi en cultivos iniciados con formas sanguíneas recién aisladas de 3 cepas (Perú, CL, Y) en dos medios distintos (Grace y L-15). Para la formación "in vi-

tro" de metacíclicos fue necesario un 10% de suero bovino de recién nacido y varios azúcares. El desarrollo fue mejor a pH 9,0 que a 5,5-6,0, permaneciendo éste relativamente estable durante los 15-17 días de cultivo. Observaron que el porcentaje de transformación variaba considerablemente dependiendo del tubo o frasco de cultivo utilizado, por lo que sugieren que la proporción de difusión de gases puede ser importante para la formación "in vitro" de metacíclicos.

De BOISO (1983) informó que durante el cultivo de Trypanosoma cruzi se acidifica continuamente el medio, disminuyendo más el pH cuanto más glucosa lleve el medio inicialmente. Encontró que la relación entre la concentración de protones que salen de la célula y la glucosa consumida es siempre cercana a 1. Esto se mantiene a pesar de modificar el pH inicial o el pH durante la fase exponencial. La acidificación disminuye la velocidad de crecimiento, así como el consumo de glucosa, pero estimularía la diferenciación a tripomastigotes finos.

KATZIN y col. (1983) obtuvieron metacíclicos con el medio GMTIIH comparándolos biológicamente con los epimastigotes. La resistencia a la lisis por suero normal de

mamífero, la capacidad de "capping", es decir, la renovación periódica de la cubierta glicoproteica que presentan únicamente las formas tripomastigotas, y el modelo de reactividad con las lectinas que ensayan, indican que los metacíclicos son más parecidos a los tripomastigotes "slender" que a los epimastigotes originales. La respuesta inmune estimulada por metacíclicos fue más alta que la inducida por los epimastigotes, lo que puede estar relacionado con la capacidad de los metacíclicos para resistir la lisis por el complemento de mamífero, originando un mayor grado de infección.

WILLIAMS (1983 y 1984) estudió la transformación de amastigote a epimastigote y tripomastigote de T. cruzi extracelularmente. Al tratar con inhibidores de la enzima ADP-ribosil-transferasa, como nicotinamida y 3-amino-benzamida, se bloqueaba la diferenciación a concentraciones que no afectaban significativamente al crecimiento. Sugiere que esta enzima nuclear está incluida en la diferenciación de protozoos, al igual que, como ya se ha propuesto, interviene en la diferenciación de células de vertebrados (mioblastos, hepatocitos, ...) y que podría ser un tema de estudio para quimioterápicos contra diversos protozoos.

Tanto en procariotas (MALLICK y HERRLICH, 1979) como en eucariotas (PASTAN y col., 1975; PRASAD, 1975) se han detectado cambios en la concentración intracelular de AMPc que modulan su metabolismo y su crecimiento.

En protozoos se han hecho también algunas observaciones en este sentido. Así, se ha demostrado que cerca del 100% de las formas intraeritrocíticas de Plasmodium falciparum se diferencian a gametocitos en respuesta a concentraciones extracelulares de AMPc de 1 mM en cultivos de crecimiento estacionario, mientras que en cultivos de crecimiento rápido, esta transformación por AMPc no tiene lugar (KAUSHAL y col. 1980).

Desde hace tiempo se conoce que los productos metabólicos de Trypanosoma lewisi, parásito de las ratas, inducen inmunización en éstas frente a él. Esto se debe a la producción del anticuerpo ablastina por el hospedador. Este anticuerpo induce la transformación de T. lewisi de la forma reproductora (epimastigote) a la no reproductora (tripomastigote). La medida de la concentración de AMPc intracelular en ambas formas permitió comprobar que ésta es el doble en las segundas, por lo que STRICKLER y PATTON (1975) sugieren que la ablastina es la causante de este aumento de AMPc intracelular, induciendo la diferenciación.

Igualmente, se ha comprobado que durante la parasitemia producida por Trypanosoma brucei brucei en ratas, hay cambios en el contenido de AMPc intracelular de los parásitos. La concentración máxima coincide con el pico de parasitemia, donde predominan las formas "long slender". Cuando las formas intermedias aparecen en la población y el porcentaje de formas "long slender" decrece, hay una disminución del contenido medio del nucleótido cíclico por célula. Los niveles inferiores de AMPc intracelular tienen lugar, aproximadamente, cuando las formas "long slender" se hallan en el más bajo porcentaje del total de la población y las formas "short stumpy" comienzan a predominar. Se sugiere una correlación entre los cambios en los tipos morfológicos y la concentración intracelular de AMPc (MANCINI y PATTON, 1981).

En Trypanosoma cruzi se han detectado los enzimas adenil-ciclasa y AMPc-fosfodiesterasa, y se han medido los niveles de AMPc intracelular, además de la actividad de estos dos enzimas, a lo largo del desarrollo de un cultivo en medio LIT, que no llegó a la diferenciación (FRANCO Da SILVEIRA y col., 1977; GONÇALVES y col., 1980).

Durante el cultivo, de 7 días, no se observa va

riación en la actividad de la fosfodiesterasa, apreciándose, por otra parte, un descenso progresivo en los niveles de AMPc y dos máximos en la actividad adenil-ciclase, uno a las pocas horas de inocular el medio y el otro al tercer día del cultivo (GONÇALVES y col., 1980).

Recientemente, OLIVEIRA y col. (1984), han estudiado los niveles de AMPc intracelular de las formas epimastigotas de Trypanosoma cruzi en crecimiento y los cambios producidos por los inhibidores de la fosfodiesterasa y el efecto de los ligandos adrenérgicos. En definitiva, un incremento en los niveles de AMPc intracelular conduce a una inhibición del crecimiento y de la incorporación de timidina tritiada. Los autores proponen un mecanismo de control del crecimiento por receptores de membrana del protozoo similares a los beta-adrenérgicos, los cuales alternativamente activan la enzima adenil-ciclase para incrementar los niveles intracelulares de AMPc. Estos causan inhibición de la síntesis de DNA con la consiguiente inhibición de la división celular.

Entre los puntos claves para desarrollar un medio de cultivo para Trypanosoma cruzi, ROITMAN (1976) considera que está el hallar una osmolaridad adecuada para el buen desarrollo del protozoo, pues otros tripanosomátidos como T. brucei y Crithidia fasciculata, crecen mejor en medios hipertónicos.

Ya en 1972, ELLENBOGEN y col. informaron de un requerimiento osmótico para el crecimiento del tripanosomátido Crithidia fasciculata. Trabajando con medios de presión osmótica baja y aumentándola con diversos electrolitos ( $\text{ClNa}$ ,  $\text{ClK}$ ,  $\text{SO}_4\text{K}_2$ , ....) y no electrolitos (sorbitol, manitol, glicerol, ...) no observaron especificidad de agente osmótico para el requerimiento. Sin embargo, la inactividad de otro agente osmótico, pentaeritritol, indicaba que la presión osmótica era una probable, aunque insuficiente, condición para satisfacer un crecimiento aumentado por la temperatura.

Al estudiar el efecto de la temperatura y de la osmolaridad en el crecimiento de varias especies del género Crithidia y de Herpetomonas samuelpessoai, en medios definidos, TAVARES Da SILVA y ROITMAN (1982) observaron que, en general, a mayores temperaturas se obtiene mejor

crecimiento a las mayores osmolaridades.

Sin embargo, CROSS y col. (1975a) cultivaron Trypanosoma cruzi en un medio definido HX25M desarrollado para T. brucei (CROSS y MANNING, 1973) y modificado por CROSS y col. (1975b). El crecimiento que obtuvieron fue inferior al de T. brucei y lo achacaron en parte a la elevada presión osmótica del medio que, quizás, lo hiciera inadecuado para el cultivo de T. cruzi.

ALMEIDA y SOUZA (1978) observaron que al incrementar la osmolaridad del medio de cultivo de 170 a 770 mOsmoles con ClNa, ClK o glicerol, se estimulaba la transformación de las formas de cultivo de Herpetomonas samuel-pessoai en promastigotes.

Los requerimientos vitamínicos de las formas de cultivo de Trypanosoma cruzi parecen variar con el tipo de medio en el que los parásitos son estudiados.

Estudios con medio BONE y PARENT (1963) sugieren que los flagelados requieren sólo ácido fólico y tiamina. Sin embargo, cuando los parásitos son estudiados en medio semisintético de CITRI (1954) parece que necesitan tiamina, ácido fólico, riboflavina, PABA, vitamina B<sub>12</sub>, factor citrovorum (ácido tetrahidrofólico) y nicotinamida.



AVILA y AVILA (1981) usando un medio de cultivo definido afirman que ácido fólico y colina son sólo necesarios para un alto rendimiento de T. cruzi, sugiriendo que los epimastigotes pueden satisfacer, al menos parcialmente, sus requerimientos vitamínicos.

Existen factores intrínsecos del insecto vector que podrían influir en el ciclo de vida de T. cruzi (BRENER y ALVA-RENGA, 1976) como los organismos simbiotes descritos en el intestino de las chinches triatómidas (CAVANAGH y MARSDEN, 1969). MUHLPFORDT, en 1959 investigó la influencia de tales simbiotes en el ciclo de vida de T. cruzi, demostrando que el parásito, al menos aparentemente, se multiplica más rápidamente en Rhodnius prolixus libre de su simbiote obligado y monoxénico, Nocardia rhodnii, que en vectores conteniendo este actinomiceto. Sin embargo, la diferenciación fue bastante similar en insectos estériles y colonizados por este microorganismo.

Nocardia y otros microorganismos han sido considerados como sintetizadores de vitaminas B, para cubrir las necesidades de la chinche, ejerciendo así, probablemente, una influencia local en las condiciones del intestino, lo cual podría afectar la evolución del parásito (BRENER y ALVARENGA, 1976).

Un extenso estudio en este sentido fue publicado por NYIRADI (1973), en el que coincide con MACARINI y GARCIA (1972) en que R. prolixus es, aparentemente, dependiente de N. rhodnii para su normal desarrollo, mientras que las especies de Triatoma son capaces de desarrollarse sin simbiosis.

La capacidad de N. rhodnii para excretar y producir algunas vitaminas del grupo B fue estudiada por MACARINI y CORREIA (1978) constatando la excreción de ácido fólico y piridoxina, no pudiendo detectar la excreción de colina, riboflavina, cianocobalamina, ácido pantoténico y ácido nicotínico. Como MACARINI y GARCIA (1972) habían demostrado que la ausencia de este simbiote en Rhodnius prolixus retarda su muda, alcanzando raramente la fase adulta, MACARINI y CORREIA piensan que ello se debe a la dependencia del insecto de las vitaminas excretadas por el actinomiceto.

MACARINI y GARCIA (1972) habían obtenido un medio complejo para el cultivo de Nocardia rhodnii que contenía unas 50 sustancias orgánicas. Posteriormente, MACARINI (1978) fue eliminando la mayoría de ellas consiguiendo un desarrollo adecuado del microorganismo, llegando

así a obtener un medio sintético simple que contenía acetato, tiamina, ácidos glutámico y aspártico o sus amidas, fosfato, sulfuro, magnesio, hierro, molibdeno, manganeso y zinc. El acetato no podía ser sustituido por otras fuentes carbonadas y los simbioses no requerían nitrógeno inorgánico. El crecimiento máximo se dió entre 32-34°C, a pH 7,0.

Pocos estudios se han realizado hasta el momento sobre la metionina en tripanosomátidos. Así cabe destacar los trabajos de GUTTMAN en 1967 en los que observó un pre-requisito para la síntesis de metionina en algunos Trypanosomatidae, entre los que se encontraban Trypanosoma ranarum y T. mega, parásitos de batracios, que consistía en un nivel <sup>u</sup>inusualmente alto de ácido fólico en el medio de cultivo (0,1 mg/100 ml). Vió que la hidrólisis de este ácido seguía permitiendo esta biosíntesis, sin llegar a determinar qué factor era el esencial.

Entre los protozoos parásitos la síntesis de novo de esteroides se limita a Kinetoplastida. Crithidia fasciculata incorpora acetato, mevalonato y metionina a ergosterol y Trypanosoma lewisi, tanto en su forma de cultivo como en la sanguínea, y las formas de cultivo de T.

rhodesiense, pero no sus formas sanguíneas, sintetizan esteroides a partir de acetato y metionina. Esta ruta metabólica es desconocida (GUTTERIDGE y COOMBS, 1977).

Durante la respuesta quimiotáctica de bacterias Gram negativas, las sustancias que actúan como estímulo externo interaccionan, solas o unidas a proteínas del espacio periplasmático, con unas proteínas específicas insertas en la membrana citoplasmática, cambiando su conformación espacial y siendo capaces de recibir grupos metilo de la S-adenosil-metionina, por medio de la enzima metiltransferasa dependiendo el grado de respuesta celular del número de grupos metilo incorporados por la proteína (a mayor número de metilaciones, mayor respuesta quimiotáctica) (HERRERO y col., 1984).

## 2.2.- PRODUCCION DE NH<sub>4</sub><sup>+</sup> POR Trypanosoma cruzi

Se sabe, desde hace tiempo, que Trypanosoma cruzi excreta amonio. Así, Von BRAND y col. (1949), consideran que tras el consumo de la glucosa del medio de cultivo, las formas epimastigotas pasan a tener un metabolismo fundamentalmente proteico. El mero consumo de los ácidos orgánicos producidos por el metabolismo de la glucosa pueden elevar el pH a niveles neutros, pero el hecho de que un pH similar sea alcanzado por cultivos prácticamente sin azúcar inicial indica que se produce alguna sustancia básica y quizás sea amonio.

TOBIE y col. (1950) y RYLEY (1956), informaron que T. cruzi en medios sin azúcares produce cantidades importantes de amonio.

Herpetomonas spp. excreta amonio y especies que no poseen enzimas para el metabolismo de la ornitín-arginina, tales como Trypanosoma spp., también excretan amonio, probablemente originado en otras áreas metabólicas. Especies de Leptomonas, Leishmania, Crithidia y Blastocri-thidia, que poseen arginasa, pueden excretar tanto amo-

nio como urea. Por ello, los epimastigotes de Trypanosoma cruzi son clasificados como amoniotélicos (YOSHIDA y CAMARGO, 1978).

De igual manera, la secreción activa de diferentes sustancias de tipo básico como amonio, aminas primarias y bases débiles en general, ha sido descrita en kinetoplástidos por diversos autores (BROOKER y VICKERMAN, 1964; DVORAK y SCHMUÑIS, 1972; BACCHI y col., 1978).

La producción de amonio se debe fundamentalmente a los enzimas glutamato deshidrogenasa y D-aminoácido oxidasas en protozoos, según sugieren GUTTERIDGE y COOMBS (1977).

Diversos autores han estudiado, en las formas epimastigotes de T. cruzi, la actividad glutamato deshidrogenasa dependiente de NAD (WALTER y EBERT, 1979; CALDAS y col., 1980; CARNEIRO y col., 1983; URBINA y AZAVACHE, 1984) y de NADP (WALTER y EBERT, 1979; CAZZULO y col., 1977b; CALDAS y col., 1980; CARNEIRO y CALDAS, 1983) aunque no están de acuerdo en sus conclusiones sobre cuál es el enzima principal responsable de la excreción de amonio.

También se ha detectado actividad glutamato deshidrogenasa dependiente de NADP en las formas amastigotas y tripomastigotas sanguíneas de este parásito (ROGERSON y GUTTERIDGE, 1980).

Por otra parte, se ha observado que tras la fagocitosis de algunos organismos por células, la fusión lisosomal está disminuida o ausente, como es el caso de Mycobacterium tuberculosis (ARMSTRONG y HART, 1971) o de Toxoplasma gondii (JONES y HIRSCH, 1972).

GORDON y col. (1980) argumentaron que la sustancia responsable de la evasión de la fusión lisosomal podía ser el amonio.

La secreción activa de sustancias básicas (amonio, aminas o poliaminas) podría ser la defensa del parásito frente a la, de otra forma, inevitable fusión lisosomal. La secreción de algunas de estas sustancias ya ha sido descrita en Trypanosoma cruzi (Von BRAND y col., 1949; BACCHI, 1981).

En nuestro laboratorio, GAMARRO CONDE (1984) y OSUNA y col. (1985a) han llegado a la conclusión de que los amastigotes de T. cruzi inhiben de alguna manera la fusión lisosomal en la célula huésped, y que esta inhibi

ción no se produce por efecto de las poliaminas y sí por cloruro amónico.

### 2.2.1.- FORMACION DE CRISTALES POR MICROORGANISMOS

La intervención de las bacterias en la formación de cristales exocelulares es conocida desde hace tiempo. Los primeros estudios se dirigieron hacia la formación de cristales de carbonato cálcico por estos microorganismos (KELLERMAN y SMITH, 1914; BLACK, 1933; GREENFIELD, 1963) llegando a ser considerado, por algunos autores, (BOQUET y col., 1973), como un fenómeno general, siendo función del medio usado.

Además de calcita ( $\text{CO}_3\text{Ca}$ , hexagonal), otros cristales son precipitados por determinadas bacterias. Así, ENNEVER y col. (1971 y 1974) y STRECKFUSS y col. (1974) estudian la producción de apatito (fosfato cálcico); RAMOS-CORMENZANA y col. (1975) describen la formación de estroncianita (carbonato de estroncio); BILLY y col. (1976) encuentran cristales de estruvita (fosfato de amonio y magnesio hexahidratado) junto con aragonito ( $\text{CO}_3\text{Ca}$ , ortorrómbico) en un medio de cultivo líquido.



Ya en 1889, ROBINSON opinaba que los microorganismos pueden formar estruvita, ya que aquéllos producen amonio de la materia orgánica en la que crecen, el cual se combina con el fosfato magnésico presente para formar dicho cristal.

Los primeros en hallar estruvita en colonias de microorganismos fueron BEAVON y HEATLEY (1962) trabajando con Staphylococcus aureus, encontrando que otros organismos, todos los cuales incrementan el pH del medio durante el crecimiento, formaron cristales similares.

Más tarde, SHINANO y SAKAI (1975), trabajando con Pseudomonas calciprecipitans, una bacteria marina, y distintas relaciones  $Mg^{2+}/Ca^{2+}$  en su medio de cultivo, consiguieron precipitar  $CO_3Ca.H_2O$ , calcita y estruvita. Ellos sugieren que dicha relación es el más importante de los factores que controlan los tipos de cristalización. Obtienen estruvita siempre que la relación  $Mg^{2+}/Ca^{2+}$  es mayor de 4, aunque a una relación 3 encuentran trazas de este cristal.

También en bacterias del suelo productoras de calcita se ha investigado la capacidad de formación de estruvita extracelular, encontrándose ésta en 20 cepas

de las 96 estudiadas. El  $\text{Ca}^{2+}$  pareció inhibir dicha formación (RIVADENEYRA y col., 1983).

Por último, FERRON-VILCHES y col. (1984) han demostrado la precipitación de calcita y estruvita por bacterias de agua dulce. Estudiando 71 cepas demostraron que el número de ellas productoras de estruvita es máximo (67) cuando la relación fosfato/magnesio en el medio de cultivo es 1, disminuyendo dicho número (63) si la concentración de ión magnesio se eleva (relación 1:2).

Hasta el momento, según la bibliografía consultada (Banco de Datos BIOS, mediante ordenador de la Red INCA), no se había detectado esta capacidad de formación de cristales exocelulares en células eucariotas.

### 2.3.- METABOLISMO GLUCIDICO DE Trypanosoma cruzi.

Trypanosoma cruzi, tanto en su forma epimastigota de cultivo, tripomastigota sanguínea como amastigota intracelular, es capaz de respirar y retener su motilidad durante largos periodos de tiempo en ausencia de fuentes de energía exógena (ZELEDON, 1960b; RYLEY, 1956; ROGERSON y GUTTERIDGE, 1978). Esta situación contrasta marcadamente con las formas sanguíneas de los tripanosomas africanos del subgrupo T. brucei, de metabolismo menos oxidativo. Este comportamiento implica la existencia de importantes reservas endógenas de energía (aproximadamente 5% del peso seco, según GUTTERIDGE y ROGERSON, 1979). El contenido en carbohidratos de su organismo es demasiado bajo (pequeñas cantidades de glucosa y trehalosa, 0,06% y 0,05% del peso seco, respectivamente, han sido detectadas por FAIRBAIRN, 1958) para que sea un polisacárido el sustrato endógeno, habiéndose demostrado la ausencia de macromoléculas del tipo de glucógeno (ROGERSON y GUTTERIDGE, 1980). En este sentido, RYLEY (1956), demostró que T. cruzi no almacena polisacáridos y que el metabolismo endógeno se debe, aparentemente, a la utilización de grasas y proteí-

nas. Por su parte, ROITMAN y GUTTERIDGE (1978) indican que el sustrato endógeno lo constituyen, sobre todo, triglicéridos.

Los ácidos grasos pueden constituir una fuente de energía exógena en epimastigotes (WOOD, 1975), tripomastigotes de cultivo (WOOD y SCHILLER, 1975) y amastigotes intracelulares (ROGERSON y GUTTERIDGE, 1980) de T. cruzi, aunque detallados análisis cuantitativos demuestran que tanto los azúcares como los aminoácidos son utilizados preferentemente por las distintas formas celulares de este parásito (ROGERSON y GUTTERIDGE, 1980).

Monosacáridos tales como glucosa, fructosa, manosa, galactosa y xilosa y aminoácidos tales como prolina, glutamato, aspartato, leucina y treonina, pueden ser consumidos y/o oxidados por epimastigotes, aunque treonina probablemente actúa como fuente de unidades acetato para la síntesis de ácidos grasos más que como fuente de energía (ZELEDON, 1960c; SYLVESTER y KRASSNER, 1976; CROSS y col., 1975a; ROGERSON y GUTTERIDGE, 1978 y 1980; LEHMANN, 1963). Sin embargo, estas formas no son capaces de utilizar maltosa, manitol, lactosa, sacarosa, trehalosa, arabinosa y galactosa (LEHMANN, 1963). El consumo de azúcares

solubles (glucosa) se realiza por mecanismos de transporte activo a concentraciones de sustratos bajas, si éstas son altas se realiza por difusión facilitada (WARREN y PATRZEK, 1963; Von BRAND y col., 1967). Similares resultados en cuanto a consumo se obtuvieron con formas amastigotas y sanguíneas (ROGERSON y GUTTERIDGE, 1978 y 1980).

Trypanosoma cruzi es capaz de degradar la glucosa tanto aeróbica como anaeróbicamente. La degradación aerobia no lleva exclusivamente a la formación de  $\text{CO}_2$ , sino que constituye una mezcla de fermentación y oxidación aerobia con liberación al medio de cantidades sustanciales de succinato y acetato. En epimastigotes de cultivo se obtiene un 31,5% de  $\text{CO}_2$ , 34% de succinato, 20% de acetato, 3,8% de malato y 1% de piruvato (BOWMAN y col., 1963). En las formas sanguíneas se obtiene, además de un 55% de  $\text{CO}_2$ , un 12% de succinato, 17% de acetato, 6% de lactato y 1% de piruvato (RYLEY, 1956). La oxidación de carbohidratos por todas las formas del ciclo de vida es, probablemente, a través de la vía glucolítica y un completo ciclo de Krebs.

La degradación anaerobia (con un 5% de  $\text{CO}_2$ ) de la glucosa conduce a la obtención de un 72% de succinato,

8,9% de acetato, 1% de citrato y 9,5% de CO<sub>2</sub> (BOWMAN y col., 1963).

Von BRAND y col. (1949) siguiendo el consumo de glucosa y el pH del medio de cultivo de 4 cepas de T. cruzi comprobaron que el comportamiento de todas las cepas fue similar. A concentraciones altas de glucosa (2,9 g/l o más), su consumo origina una acidificación del medio que llega a ser un factor limitante para el crecimiento de los parásitos. Si la concentración es de 0,9 a 1,95 g/l, la acidificación va seguida de una alcalinización, alcanzándose el máximo crecimiento cuando se llega a la neutralización. Cuando la glucosa inicial no supera los 0,45 g/l, ésta no es utilizable, no acidificándose el medio pero sí alcalinizándose, obteniéndose un crecimiento moderado del parásito.

Estos autores sugieren que hay un cambio del metabolismo glucídico al proteico, con la consiguiente excreción de sustancias básicas, quizás amoníaco, que eleva rían el pH del medio. Esta producción de amoníaco es comprobada por RYLEY (1956) en formas de cultivo.

Los únicos trabajos que hay sobre el metabolismo de las formas tripomastigotas metacíclicas de cultivo

de Trypanosoma cruzi son los realizados por WOOD (1975) y WOOD y SCHILLER (1975). En el primero se informa de cómo las formas tripomastigotas, obtenidas del medio Grace modificado por WOOD y PIPKIN (1969), convierten rápidamente los ácidos palmítico, linoleico, oleico y esteárico en  $CO_2$ . Apreciables cantidades de carbono de estos cuatro ácidos grasos son incorporadas como lípidos neutros y fosfolípidos, sobre todo el ácido palmítico, por este hemoflagelado.

En el segundo trabajo se hace un estudio comparativo del metabolismo de los ácidos grasos de formas epimastigotas y tripomastigotas de este flagelado "in vitro". Mientras que los segundos convierten ácido palmítico en gran proporción a  $CO_2$ , los epimastigotes lo hacen en muy baja proporción. Estos son capaces de incorporar este ácido a lípidos neutros y fosfolípidos mientras que los tripomastigotes lo incorporan en baja proporción a lípidos neutros, careciendo, según parece, de la capacidad de incorporarlos a fosfolípidos.

Por último, aunque en ningún momento se ha puesto de relieve el posible papel de la gluconeogénesis en Trypanosoma cruzi, sí se ha sugerido la existencia de es-

ta vía metabólica por De BOISO y STOPPANI (1973) al comprobar la aparición de intermediarios marcados de la glucolisis (fosfatos de hexosas y fosfoglicerato) en epimastigotes incubados en presencia de (2-<sup>14</sup>C)piruvato, (2-<sup>14</sup>C)acetato y (1-<sup>14</sup>C)acetato. Por otra parte, al menos en una ocasión, se ha detectado actividad glucosa-6-fosfatasa al utilizarla como enzima marcadora de la fracción microsomal de un homogenado de epimastigotes de T. cruzi (ZINGALES y col., 1978).

#### Glucolisis.-

La vía glucolítica de Embden-Meyerhof es el principal camino degradativo de la glucosa en este kinetoplásmo. No hay duda de su funcionalidad. Los intermediarios fosforilados correspondientes a esta vía han sido detectados cromatográficamente (SHAW y col., 1964).

En las formas epimastigotas de cultivo se ha demostrado actividad hexokinasa, fosfoglucosa isomerasa, fosfofructokinasa, triosa-fosfato isomerasa y gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa por BAERNSTEIN (1953b), aldolasa por BAERNSTEIN y REES (1952) y piruvato kinasa por JUAN y col. (1976a). RAW (1959) y DOCAMPO y col. (1976) confirman



la actividad gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa.

En un estudio comparativo realizado por STOHLMAN y col. (1973), la actividad aldolasa es determinada en epimastigotes y tripomastigotes de cultivo de células Vero, observándose que en los primeros la actividad fue más del doble de la de tripomastigotes.

En las formas amastigotas intracelulares y tripomastigotas sanguíneas se ha detectado actividad de los tres enzimas clave de la glucólisis: hexokinasa, fosfofructokinasa y piruvato kinasa (ROGERSON y GUTTERIDGE, 1980), así como actividad enolasa (TAYLOR y col., 1980). Sólo la primera fue significativamente inferior en amastigotes que en tripomastigotes y epimastigotes, aunque es improbable que esto tenga una significación biológica ya que puede deberse a un artefacto que se introduce durante el proceso de aislamiento de estas formas.

Según RYLEY (1956), la degradación aerobia de la glucosa lleva a la producción de pequeñas cantidades de lactato por los tripomastigotes, pero en epimastigotes, según BOWMAN y col. (1963) no se detecta. A pesar de ello, GEREZ De BURGOS y col. (1976) demuestran, en estas últimas formas, actividad alfa-hidroxiácido deshidrogenasa utili-

zando como sustrato, entre otros ensayados, lactato. En 1978 y 1980, GEREZ De BURGOS y col. y CORONEL y col., respectivamente, prosiguen estos estudios.

ROGERSON y GUTTERIDGE (1980) detectan actividad láctico deshidrogenasa en las tres formas estudiadas de T. cruzi sin variación significativa entre ellas.

Aunque la actividad fosfoglicerato kinasa y fosfoglicero-mutasa aún no han sido detectadas, no se duda de su existencia en estos protozoos.

En 1977 se localiza en Trypanosoma brucei un orgánulo similar a los microsomas en el que se encuentran los enzimas glucolíticos implicados en la conversión de glucosa a 3-fosfoglicerato. A este orgánulo se le denominó glicosoma (OPPERDOES y BORST, 1977). En 1980, TAYLOR y col. consiguen localizar varios enzimas glucolíticos en el glicosoma de T. cruzi en epi-, tripo- y amastigotes. RACAGNI y MACHADO De DOMENECH (1983) y URBINA y CRESPO (1984) purifican parcialmente hexokinasa y estudian sus propiedades cinéticas. Estos últimos autores también estudian la fosfofructokinasa. De todos estos estudios concluyen que estos enzimas se encuentran poco regulados y que la localización glicosomal de los mismos puede constituir su más efectiva regulación.

Ciclo de las Pentosas.-

El ciclo de las pentosas actua en Trypanosoma cruzi, según se desprende de los estudios realizados en células enteras de este protozoo sobre consumo de glucosa marcada.

BOWMAN y col. (1963) observaron que la producción de  $^{14}\text{CO}_2$  a partir de glucosa radioactiva, fue mucho mayor en aerobiosis que en anaerobiosis, siendo apreciablemente mayor cuando se utilizó glucosa marcada en C-1 que cuando se empleó en (6- $^{14}\text{C}$ )glucosa (28% y 5,2%, respectivamente). En 1964, MANCILLA y NAQUIRA completaron este trabajo demostrando, por medio de la formación de glicerol a partir de glucosa uniformemente marcada con  $^{14}\text{C}$  o sólo en el C-6, que un 41,4% de la glucosa consumida por la cepa Tulahuén y un 27,9% de la utilizada por la cepa Perú, lo son a través del ciclo de las pentosas, al menos, en sus condiciones experimentales. Como esta cepa es menos patógena que la primera, se sugiere que la participación de esta vía alternativa del metabolismo de carbohidratos está relacionada con la patogenicidad.

La presencia de actividad glucosa-6-fosfato deshidrogenasa y 6-fosfogluconato deshidrogenasa en extrac

tos crudos de este parásito fue detectada por RAW en 1959 en epimastigotes y confirmada por STOHLMAN y col. en 1973, en epi- y tripomastigotes obtenidos en cultivo de tejidos, pero estos últimos autores no consiguieron demostrar actividad transcetolasa en ninguna de las formas estudiadas pertenecientes a la cepa Corpus Christi. ROGERSON y GUTTERIDGE en 1980 confirman la presencia de actividad de estos dos enzimas de esta vía en formas epimastigotas, amastigotas intracelulares y tripomastigotas sanguíneas de la cepa Sonya; ambos enzimas tienen una actividad similar en las tres formas estudiadas. FUNAMAYA y col. (1977) estudian las propiedades cinéticas de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa de este parásito demostrando su inhibición no competitiva por NADH.

#### Ciclo de Krebs.-

El ciclo de los ácidos tricarboxílicos funciona probablemente, tanto en las formas epimastigotas como amastigotas y tripomastigotas sanguíneas de Trypanosoma cruzi, habiéndose demostrado la mayoría de los enzimas que en él intervienen excepto alfa-cetoglutarato deshidrogenasa y succinato tiokinasa.

Diversos estudios con sustratos marcados sugirieron el funcionamiento operativo de este ciclo, como el realizado por BOWMAN y col. en 1963. BOISO y STOPPANI (1973) estudiaron la oxidación de piruvato y acetato marcados con  $^{14}\text{C}$ . La oxidación del acetato marcado en los carbonos 1 ó 2, llevó a que compuestos intermediarios del ciclo de Krebs, tales como los ácidos tricarbónicos y los ácidos succínico, fumárico y málico, apareciesen marcados. Si bien no se detectaron los ácidos oxalacético y alfa-cetoglutarico, sí aparecieron marcados los correspondientes aminoácidos, L-aspártico y L-glutámico. La elevada radioactividad de este último refleja, probablemente, la alta actividad de los enzimas implicados en la interconversión de alfa-cetoglutarato y L-glutamato, como son aspartato aminotransferasa y L-glutamato deshidrogenasa, enzimas caracterizadas por CAZZULO y col. en 1977 b. De BOISO y STOPPANI consideran que el papel oxidativo del ciclo de Krebs está, aparentemente, limitado por la ausencia de un aparato oxidativo eficiente; sin embargo, constituye una importante fuente de carbono para la biosíntesis de aminoácidos y puede contribuir al proceso gluconeogénico.

DOCAMPO y col., en 1979, investigan la oxidación

de acetato por las formas sanguíneas de T. cruzi, observando un sustancial incremento de la respiración en su presencia. Esta oxidación se realiza a través del ciclo de los ácidos tricarboxílicos e incluye una vía respiratoria sensible a la antimicina A, en cuya presencia, el consumo de oxígeno y la producción de CO<sub>2</sub> se vieron inhibidos, aunque hubo un 6-7% de consumo de oxígeno residual que no fue inhibido ni tan siquiera por altas concentraciones de antimicina A.

JUAN y col. (1977) caracterizaron parcialmente el enzima citrato sintasa de epimastigotes, encontrando que sus propiedades cinéticas y reguladoras y su peso molecular, eran similares a los de eucariotas.

Actividad aconitasa fue descrita en extractos crudos de epimastigotes (ROGERSON y GUTTERIDGE, 1976), así como malato deshidrogenasa, fumarasa y fumarato hidrogenasa (BAERNSTEIN, 1953 a y b).

Isocitrato deshidrogenasa fue parcialmente purificada y caracterizada en 1956 por AGOSIN y WEINBACH, observando que es dependiente de NADP, no encontrando actividad NAD-dependiente, aún no demostrada hasta el momento presente.

AGOSIN y Von BRAND (1955) estudian la localización intracelular y caracterizan el enzima succinato deshidrogenasa, detectado en 1953 por SEAMAN. Posteriormente, RAW (1959) confirma la actividad isocitrato deshidrogenasa y succinato deshidrogenasa en epimastigotes de T. cruzi.

Todos estos enzimas, excepto isocitrato deshidrogenasa dependiente de NAD y aspartato aminotransferasa, han sido igualmente detectados en amastigotes intracelulares y tripomastigotes sanguíneos (ROGERSON y GUTTERIDGE, 1976 y 1980), siendo la actividad de la aconitasa significativamente más baja en los primeros, aunque es improbable que esto tenga significación biológica.

STOHLMAN y col. (1973) determinan la actividad aldolasa, isocitrato deshidrogenasa NADP-dependiente, málico deshidrogenasa, alanín-aminotransferasa y aspartato amino-transferasa en epimastigotes y tripomastigotes de cultivo de células, observando siempre más del doble de actividad en las primeras formas, por lo que sugieren que la transformación de epimastigotes a tripomastigotes viene acompañada por un ajuste en las concentraciones de enzimas, lo que conlleva una reducción de actividad metabólica.

La mayoría de los ácidos del ciclo de Krebs pueden ser utilizados, al menos a pH 5, cuando aquéllos llegan a ser permeables al organismo. Estos datos sugieren la presencia de un ciclo de los ácidos tricarbónicos funcional en este protozoo. Cuatro enzimas de este ciclo han sido estudiadas con detalle: citrato sintasa, isocitrato deshidrogenasa NADP-dependiente, málico deshidrogenasa y succinato deshidrogenasa. Este último está unido a partículas mitocondriales y es estimulado por  $Ca^{2+}$  y fácilmente inhibido por malonato (GUTTERIDGE, 1976).

Al estudiar los efectos de los intermediarios del ciclo de Krebs en la respiración de las formas de cultivo de Trypanosoma cruzi, Von BRAND y AGOSIN (1955) sugieren que debe existir una secuencia parecida al ciclo de los ácidos tricarbónicos en estos parásitos, mientras que los resultados obtenidos por ZELEDON (1960a) le permiten concluir que este ciclo existe en este protozoo y discute la posibilidad de que éste juegue un papel minoritario en la producción de energía, proveyendo de precursores de una serie de aminoácidos.

MILLER y col. (1976) detectan actividad piruvato deshidrogenasa y citrato sintasa en epimastigotes de cultivo de T. cruzi.



Recientemente, CANNATA y CAZZULO (1984a) han informado acerca de la existencia de dos formas de málico deshidrogenasa localizadas en compartimentaciones diferentes dentro del tripanosoma: una glicosomal y otra mitocondrial. Sugieren que como la formación de succinato en el catabolismo de la glucosa requiere la fijación de  $\text{CO}_2$  a ácidos  $\text{C}_3$ , el enzima responsable de esta fijación sería la fosfoenolpiruvato-carboxikinasa ligada a ADP, que se encuentra en el glicosoma (CANNATA y col., 1982) que convertiría fosfoenolpiruvato en oxalacetato y éste, por acción de la málico deshidrogenasa glicosomal se reduciría a L-malato para convertirse posteriormente en succinato por acción de una fumarasa y una fumarato reductasa en la mitocondria.

CAZZULO y col. (1977b) estudian la actividad glutamato deshidrogenasa ligada a NADP y aspartato aminotransferasa, posiblemente responsables de la formación de  $\text{NH}_3$  característica del catabolismo de las formas de cultivo de este hemoflagelado. El primero es similar al de otros parásitos, pero distinto al de mamíferos. El segundo es similar al enzima de mamíferos.

Posteriormente, se ha detectado actividad glutamato deshidrogenasa NADP-dependiente en las formas amastigotas y tripomastigotas (ROGERSON y GUTTERIDGE, 1980).

Se han purificado parcialmente y estudiado las propiedades de las glutamato deshidrogenasas ligadas a NADP y a NAD de las formas epimastigotas de T. cruzi (WALTER y EBERT, 1979; CAZZULO y col., 1979 y 1980a; CALDAS y col., 1980; CARNEIRO y CALDAS, 1983; URBINA y AZABACHE, 1984). Aparentemente, la glutamato deshidrogenasa ligada a NADP tiene un papel biosintético y su actividad específica varía con la composición del medio, sin que dependa de la síntesis de novo de proteínas. Uno de sus fines podría ser biosintetizar glutamato (usando el  $\text{NH}_3$  producido por la desaminación de aminoácidos) el cual es convertido en L-alanina a través de la reacción catalizada por glutamato-piruvato transaminasa (BARROS y CALDAS, 1983). Los resultados de los trabajos con glutamato deshidrogenasa NAD-dependiente demuestran la presencia de un camino específico para la oxidación de aminoácidos, el cual se encuentra fuertemente regulado por la carga energética y la actividad del ciclo de Krebs (URBINA y AZABACHE, 1984).

#### Fijación de $\text{CO}_2$ .

El primer enzima con capacidad carboxilante cuya actividad se detecta en extractos de Trypanosoma cruzi es la enzima málica (RAW, 1959), sugiriéndose que podría ser

la responsable de la fijación de  $\text{CO}_2$  que tiene lugar durante la oxidación de la glucosa por epimastigotes intactos, rindiendo succinato como producto final, tanto aerobia como anaeróticamente, sobre todo en ambientes con un 5% de  $\text{CO}_2$ , pero no formándose en ausencia de glucosa (BOWMAN y Col., 1963). Estos autores demuestran que la existencia de una vía glucolítica y de un ciclo de Krebs funcional es esencial para la formación de succinato directamente o por fijación de  $\text{CO}_2$ , aunque no descartan la posibilidad de que el acúmulo de succinato se debiera a una baja actividad succinato deshidrogenasa.

Posteriormente se estudian los posibles enzimas fijadores de  $\text{CO}_2$  en T. cruzi, investigándose su actividad carboxilante. No se detectó actividad piruvato carboxilasa, fosfoenolpiruvato-carboxilasa y fosfoenolpiruvato-carboxi-transferasa. Sólo se observó actividad fosfoenolpiruvato-carboxikinasa ligada a ADP y enzima málica NADP-dependiente, siendo seis veces mayor en el primer caso que en el segundo, a pH 6,2 (CATALDI De FLOMBAUM y col., 1977).

Al mismo tiempo, CAZZULO y col. (1977a) estudian las propiedades de la enzima málica, parcialmente purificada, catalizando la descarboxilación de L-malato a piruvato

y  $\text{CO}_2$ , con la reducción concomitante de NADP a NADPH. La inhibición de la enzima málica por oxalacetato, probablemente por fijación de  $\text{CO}_2$  vía fosfoenolpiruvato carboxikinasa, podía ser incluida en la regulación de este proceso fermentativo, para de esta forma evitar un reciclaje de los ácidos dicarboxílicos  $\text{C}_4$  a piruvato. Si esto es así, la producción de NADPH para los procesos de biosíntesis podría no ser seriamente perjudicada por la inhibición de la enzima málica, ya que los epimastigotes de este protozoo contienen altas actividades de isocitrato deshidrogenasa (AGOSIN y WEINBACH, 1956) y glutamato deshidrogenasa (CAZZULO y col. 1977b), ambas NADP-dependientes.

Esta actividad de la enzima málica es también demostrada en formas amastigotas y tripomastigotas sanguíneas de T. cruzi por ROGERSON y GUTTERIDGE (1980), observando que en las formas intracelulares esta actividad es significativamente inferior a la de las formas epimastigotas y sanguíneas, aunque los autores consideran improbable una significación biológica de este hecho, achacándolo a un artefacto del proceso de aislamiento.

Poco después, CANNATA y col. (1979) describen la existencia de dos formas de la enzima málica con diferentes

propiedades reguladoras, estudiándose más tarde su distribución intracelular así como la de la fosfoenolpiruvato carboxikinasa (CANNATA y col, 1980; CAZZULO y col., 1980b) para seguir con un intento de localización subcelular (CANNATA y col., 1982), encontrando que esta última es particulada, localizándose en la fracción enriquecida de glicosomas, como en Crithidia fasciculata, mientras que la enzima málica I, también particulada, se encuentra en la misma fracción que citrato sintasa y ATPasa-Mg<sup>2+</sup> sensible a oligomicina, sugiriendo su localización mitocondrial. La enzima málica II se encuentra en el citosol, como la única enzima málica de C. fasciculata. El hecho de que estas enzimas se encuentren en compartimentos celulares distintos es significativo para la prevención de un ciclo fútil entre ácidos dicarboxílicos C<sub>4</sub> y ácidos monocarboxílicos C<sub>3</sub>, el cual podría tener lugar si ambas enzimas funcionaran en el mismo compartimento celular.

#### Citocromos.-

Ya en 1956, RYLEY detectó pigmentos citocrómicos en formas de cultivo de Trypanosoma cruzi, encontrando actividad citocromo-oxidasa y succínico-oxidasa. Posteriormente, estudios citoquímicos al microscopio óptico han con

firmado la existencia de actividad citocromo-oxidasa, NADH- y NADPH-diaforasa (KALLINIKOVA, 1968), mientras que al microscopio electrónico se han localizado en la membrana interna de las crestas mitocondriales en las formas epimastigotas, amastigotas y tripomastigotas sanguíneas de este parásito (WARTON, 1977; De MEIRELLES y De SOUZA, 1982).

Los citocromos "b", "c<sub>558</sub>", "a+a<sub>3</sub>" y uno del tipo "o", han sido detectados espectrofotométricamente en epimastigotes (ROGERSON y GUTTERIDGE, 1979; De BOISO y col., 1979a), amastigotes y tripomastigotes (ROGERSON y GUTTERIDGE, 1979) de T. cruzi, aunque en cantidades menores que en la mayoría de las otras células eucariotas.

El consumo de oxígeno es parcialmente inhibido por cianuro y antimicina A, en presencia de glucosa, en células completas (ROGERSON y GUTTERIDGE, 1979; De BOISO y col., 1979b; STOPPANI y col., 1980) y en extractos mitocondriales crudos en presencia de succinato o alfa-glicerofosfato (ROGERSON y GUTTERIDGE, 1979), indicando que en las tres formas del hemoflagelado, los citocromos forman parte de una cadena respiratoria que funciona manteniendo el balance redox de la célula.

La fracción de la utilización de oxígeno no

sensible al cianuro ni a la antimicina A, es también insensible al ácido salicilhidroxámico, lo que puede explicarse con la existencia de un citocromo del tipo "o" que funciona como una oxidasa alternativa (ROGERSON y GUTTERIDGE, 1979). Sin embargo, FELIX y col. (1978) observaron, en estudios realizados con epimastigotes, que durante la fase estacionaria del cultivo, T. cruzi tiene una respiración sensible al ácido salicilhidroxámico.

Los datos obtenidos sobre los lugares de fosforilación de la cadena de transporte electrónico de Trypanosoma cruzi son aún escasos. Estudios bioquímicos, realizados en homogenados totales y en fracciones de membrana plasmática, han demostrado la existencia de ATPasa activada por  $Mg^{2+}$  (PEREIRA y col., 1978; ZINGALES y col., 1979). Otra ATPasa activada por  $Mg^{2+}$  y sensible a la oligomicina ha sido detectada en la mitocondria de este flagelado (De SASTRE y STOPPANI, 1973; FRASCH y col., 1978b).

De MEIRELLES y De SOUZA (1984) y FRASCH y col., (1978b) detectaron actividad ATPasa- $Mg^{2+}$  insensible a la oligomicina localizada en la membrana plasmática, probablemente la misma que la descrita por PEREIRA y col. (1978) y ZINGALES y col. (1979). FRASCH y col. (1978a) han conseguido

do solubilizar una ATPasa-Mg<sup>2+</sup> y CATALDI De FLOMBAUM y col. (1980) la han purificado y estudiado.

A pesar de los múltiples intentos realizados por varios autores, aún no se ha conseguido detectar actividad ATPasa-Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>. FRASCH y col. (1978b) sugieren que Trypanosoma cruzi podría mantener una alta proporción intracelular de K<sup>+</sup>/Na<sup>+</sup> a través de la propia acción de la ATPasa-Mg<sup>2+</sup> localizada en la membrana plasmática. Mientras De MEIRELLES y De SOUZA (1984) sugieren que, además, podría intervenir en el control intracelular de iones una vacuola contráctil, similar a la descrita en otros organismos tripanosomátidos como Leptomonas collosoma (LINDER y STAEHELIN 1979).

AGOSIN y col. (1976a y b) tras realizar un examen espectrofotométrico de fracciones microsomales de epimastigotes de T. cruzi identifican el citocromo "P<sub>450</sub>". Según estos autores, éste parece ser una oxidasa terminal de un sistema mono-oxigenasa ligado a NAD(P)H, el cual podría estar relacionado con los procesos de destoxicación de drogas semejante al que tiene lugar en otros tipos de células.



### 3.- M A T E R I A L   Y   M E T O D O S

### 3.1.- MATERIAL BIOLÓGICO UTILIZADO

#### 3.1.1.- EL PARASITO: Trypanosoma cruzi.

La infección por Trypanosoma cruzi está limitada a Centro y Sudamérica. La enfermedad causada por este organismo, enfermedad de Chagas, tiene una mortalidad del 5% en la fase aguda (KOBBERLE, 1968); en la fase crónica es difícil evaluar dicha mortalidad. Se estima que entre diez y doce millones de personas están actualmente infectadas por este parásito. (BRENER, 1979).

Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi es un protozoo flagelado del orden Kinetoplastida y de la familia Trypanosomatidae, transmitido por insectos vectores del orden Hemiptera, familia Reduviidae, subfamilia Triatominae, la cual agrupa nueve géneros, siendo los más comunes e importantes Panstrongylus, Rhodnius y Triatoma. La infección también puede ser transmitida por transfusiones sanguíneas. En México, el 4,4% de los donantes de sangre fueron serológicamente positivos frente a T. cruzi (GOLDSMITH y col., 1978). Estos se comportan como importantes reservorios del

parásito, junto a otros hospedadores como ratas, perros, murciélagos, perezosos y diversos primates no humanos. La transmisión tiene lugar tanto en ambientes rurales como urbanos. La incidencia de esta parasitosis es mayor en los niños.

CARLOS CHAGAS descubrió en 1909 la forma infectiva de T. cruzi por casualidad, cuando realizaba estudios sobre los vectores de la malaria (CHAGAS, 1909) en Lassance, población de Brasil en el estado de Minas Gerais. Identificó el vector y el agente de una enfermedad que aún tenía que ser descrita en el hombre. Inoculó diferentes especies de mamíferos y dedujo que todos ellos podían ser infectados e, incluso, algunos morían. Supuso que la infección también afectaba al hombre y así emprendió un estudio en el Brasil rural, donde encontró vectores y personas infectados. Durante los años siguientes, CHAGAS (1911) describió los principales rasgos clínicos de la enfermedad a la que dió nombre, así como la morfología de la fase tripomastigota de su agente causante. El denominó a este parásito como Trypanosoma cruzi en honor de su profesor Oswaldo Cruz.

El ciclo de vida completo de este parásito fue

descrito por BRUMPT en 1912 y la patología causada por el flagelado por VIANNA en 1914.

### Morfología.-

Trypanosoma cruzi es un flagelado polimórfico que, según se encuentre en su hospedador vertebrado o invertebrado y según sea su localización el mismo, presenta distinta morfología.

Las formas que puede adoptar el parásito, fundamental y característicamente, son:

#### - Formas tripomastigotas sanguíneas:

Se encuentra en la sangre de los mamíferos parasitados, sobre todo en la fase aguda de la enfermedad. Son pequeñas y alargadas, de 10 a 30 micras de largo y de 1 a 6 micras de ancho, e incapaces de dividirse.

El cuerpo adopta, generalmente, la forma de "S" o de "C". Presentan un kinetoplasto grande, redondo o puntiagudo, situado a poca distancia del extremo posterior.

Desde el kinetoplasto parte un flagelo que forma una membrana ondulante poco plegada, quedando libre un tercio de su longitud total. El núcleo ocupa aproximadamente un tercio del cuerpo.

Hay dos tipos de tripomastigotes sanguíneos:

Unos son delgados y de gran movilidad, con núcleo alargado, kinetoplasto subterminal y un corto flagelo libre. Estas formas se denominan "slender".

Otros son más gruesos, con movimientos más lentos, núcleo oval y kinetoplasto terminal y un largo flagelo libre. Se denominan "broad o stout".

BRENER (1969) sugirió que las formas "slender" son las que invaden los tejidos, mientras que las "broad" permanecen en la sangre.

- Forma amastigota:

Al penetrar las formas tripomastigotas en el interior de las células del hospedador vertebrado, su cuerpo se acorta gradualmente, el flagelo se retrae y toman la forma redondeada típica de los amastigotes. Son formas ovoides que miden aproximadamente entre 2,4 y 6,5 micras de diámetro. El kinetoplasto es grande y muy compacto, de forma bacilar y situado excéntricamente en el citoplasma. Tras un periodo de reposo de 36 horas, después de penetrar en la célula hospedadora, se dividen por fisión binaria.

- Formas epimastigotas:

Están localizadas en el intestino del hospedador

invertebrado. Estas formas presentan un flagelo libre bastante largo, un cuerpo más grande que el de las formas tripomastigotas (de 10 a 40 micras de largo), kinetoplasto bacilar situado cerca del núcleo y anterior al mismo y una membrana ondulante corta. Son formas que se reproducen de manera muy activa, por bipartición longitudinal, en el intestino del hospedador invertebrado.

- Formas tripomastigotas metacíclicas o metatripomastigotas:

Se localizan en el extremo posterior del intestino del insecto vector, por transformación de las formas epimastigotas. Son formas más finas que las tripomastigotas sanguíneas, midiendo aproximadamente 17-22 micras de largo. El kinetoplasto es grande, puntiforme y se encuentra próximo al extremo posterior, en posición subterminal.

El núcleo es alargado y no muy bien definido. La membrana ondulante es estrecha y posee un corto flagelo libre.

Son formas muy móviles que se liberan por las excretas del vector invertebrado tras 6-15 días (en el caso de las larvas) ó 10-15 días (en el caso de ninfas y adultos) de haberse infectado la chinche.

Existen otras formas morfológicas intermedias entre las mencionadas que se consideran formas de transición, como los esferomastigotes (formas redondeadas con flagelo libre), coanomastigotes (formas aplanadas con flagelo libre) promastigotes (epimastigotes sin membrana ondulante), opistomastigotes (formas promastigotas con kinetoplasto subterminal) y estafilomastigotes (formas esferomastigotas agrupadas en grumos o racimos).

#### Ciclo de vida.-

La infección es transmitida por una chinche triatómida la cual se alimenta, característicamente, por la noche. Las chinches pican cerca de las mucosas o de los ojos ingiriendo sangre y defecando inmediatamente cerca del lugar de la picadura. Sus heces contienen el parásito. La picadura en sí es indolora, pero a continuación el área afectada comienza a picar, provocando el rascado de la zona por la víctima, con lo que las heces, y de este modo el protozoo, penetran en la herida o en las membranas mucosas.

La infección puede también ocurrir sin un contacto directo con la chinche. En las zonas rurales de Brasil, donde predominan los techos de paja, las chinches triatómidas viven en los techos y sus heces caen sobre la gente

dormida, la cual puede llegar a infectarse rascándose en las zonas mucosas.

Ya que los redúvidos se alimentan sobre muchos mamíferos y que las poblaciones rurales viven en estrecha relación con su ganado y/o otros animales domésticos, la probabilidad de infección es bastante alta.

Inmediatamente después de su introducción en el organismo, el metatripomastigote penetra en una amplia variedad de células, donde se transforma en amastigote, dividiéndose activamente, para, seguidamente, transformarse en tripomastigote sanguíneo. Las células afectadas mueren liberando los parásitos que albergan, los cuales buscan el torrente sanguíneo para distribuirse por todo el organismo del hospedador infectando diversos tejidos, que incluyen las células gliales del sistema nervioso central, el músculo cardíaco, el plexo mioentérico del intestino, el tracto urogenital y el sistema retículo-endotelial.

La primera lesión, usualmente en la cara, es conocida como chagoma primario, el cual contiene sólo parásitos intracelulares (amastigotes). Los triatómidos se infectan al alimentarse de un hospedador infectado. Los tripomastigotes migran al intestino medio de la chinche, don



de se transforman en epimastigotes, procediendo a dividirse activamente. De esta manera se producen miles de organismos en el interior del vector, sin que éste parezca afectarse, quedando infectado de por vida (1-2 años). Estos epimastigotes se transforman a metatripomastigotes migrando al intestino posterior, donde son excretados con las heces.

Además, Trypanosoma cruzi puede transmitirse por contacto sexual, así como al feto a través de la placenta.

#### Patogenia.-

La enfermedad de Chagas tiene dos etapas, la aguda y la crónica. La fase aguda está caracterizada por una propagación hematológica del parásito, conduciendo a la invasión de varios órganos y tejidos. La invasión se ve acompañada de una intensa reacción inflamatoria correspondiente a la infiltración de células mononucleares.

La fase crónica es el resultado de una gradual destrucción del tejido. Por ejemplo, en el corazón, las miofibrillas y las células de Purkinje son reemplazadas por tejido fibroso. Como consecuencia de ello, hay defectos de conducción, agrandamiento del corazón y, en ocasio

nes se desarrolla un aneurisma ventricular. En el intestino, la destrucción del plexo mioentérico es responsable del desarrollo de megaesófago y megacolon.

#### Clínica.-

La fase aguda a menudo es omitida, debido a que puede ser asintomática o a que los signos que desarrolla son mal diagnosticados. La infección se da frecuentemente en la primera infancia, permaneciendo toda la vida.

El periodo de incubación es de 4 a 12 días. La fase aguda, resultante de la picadura del insecto en la cara, puede sospecharse por la aparición unilateral de edema y decoloración violácea de los párpados, también llamado signo de Romaña. La hinchazón de los párpados es firme al tacto. Puede estar asociada a conjuntivitis. Además, puede haber un nódulo, conocido como chagoma, en el lugar de la picadura, el cual es eritematoso, indurado y firme al tacto. Cuando desaparece, al cabo de unas semanas, deja un área despigmentada.

Un paciente infectado en fase aguda, puede tener una evolución sistémica que incluye fiebre, linfadenopatía, hepatomegalia, esplenomegalia y miocarditis. Algunos pacientes desarrollan signos de meningoencefalitis.

Raramente los pacientes pueden presentar "rash" morbiliforme o urticante.

La fase aguda finaliza aproximadamente, a los dos meses, aunque en raras ocasiones alcanza los cuatro meses. Los que se recuperan de la fase aguda entran en la fase crónica de la enfermedad. Sin embargo, mucha gente, quizás la mayoría, permanecen asintomáticas por el resto de sus días. Otros permanecen bien durante años antes de desarrollar síntomas y signos de enfermedad crónica, la cual tiene lugar de dos formas, principalmente, cardíaca y gastrointestinal, ésta predominante. Al menos la mitad de los pacientes afectados por la enfermedad de Chagas, tienen electrocardiogramas anormales.

La forma cardíaca puede ser silenciosa y limitada a anormalidades electrocardiográficas, correspondientes a defectos de conducción que constituyen las causas últimas de un completo bloqueo cardíaco. Clínicamente, los pacientes experimentan extrasístoles, agrandamiento del ventrículo derecho y, eventualmente, fracaso cardíaco.

La forma gastrointestinal incluye el desarrollo de megaesófago y megacolon. El último es anunciado por disfagia y, más tarde, regurgitación. Esto conduce a la

constipación y retención fecal. El megaesófago es la anomalía predominante del sistema digestivo; la mayoría de los pacientes con megacolon, también tienen megaesófago.

La enfermedad no se limita al corazón y al intestino. Raramente conduce a megauréteres, megavejiga, megavesícula biliar y bronquiectasis.

Los fallos del corazón son la primera causa de muerte en la enfermedad de Chagas.

#### Diagnóstico.-

El diagnóstico de la enfermedad aguda depende del descubrimiento de los tripomastigotes de T. cruzi en la sangre del paciente. Si el examen directo de un frotis sanguíneo fracasa para revelar el parásito, puede ser posible detectarlo en el sobrenadante, después de que la muestra de sangre haya sido centrifugada, o en el suero sobrenadante de una muestra de sangre que se ha dejado coagular. Otra investigación de los parásitos puede revelar su presencia en una biopsia obtenida de un músculo esquelético dolorido, por ejemplo, el gastrocnemio. Otros métodos de diagnóstico incluyen el cultivo de la sangre en un medio, inoculación de ratones y xenodiagnosia. El último incluye la colocación de un redúvido, mantenido en

el laboratorio y no infectado, sobre la piel del paciente. Una vez que la chinche ha tomado sangre del individuo, es mantenida durante 6 semanas y entonces es sacrificada para determinar si está o no infectada.

Hay también pruebas serológicas de variada utilidad. El test de inmunofluorescencia indirecta puede detectar individuos infectados tan sólo dos semanas antes de la prueba. Este test serológico es el que más pronto llega a ser positivo. Otras pruebas detectan precipitinas y aglutininas. La fijación del complemento llega a ser positiva a las 6 semanas post-infección.

En pacientes con infección crónica, el diagnóstico directo es más difícil, ya que hay muy pocos tripomastigotes circulantes. La xenodiagnosis es el método más útil, pues puede detectar la infección en un 50% de los pacientes. En los otros, se ha de confiar en un test serológico positivo junto con los síntomas y signos compatibles con la enfermedad de Chagas.

#### Tratamiento.--

El tratamiento no es completamente satisfactorio. El nifurtimox parece erradicar la parasitemia durante la fase aguda de la infección y puede causar una cura radical.

Pero el efecto es menor en la forma crónica de la enfermedad. Además, hay diferencias de susceptibilidad de los tripanosomas a la droga, algunos parecen ser relativamente resistentes.

El nifurtimox tiene serios efectos secundarios. Causa anorexia y vómitos, desórdenes del sueño y polineuritis.

La enfermedad crónica debe ser tratada sintómicamente con regímenes cardíacos adecuados. Megacolon y megaesófago son susceptibles de intervención quirúrgica.

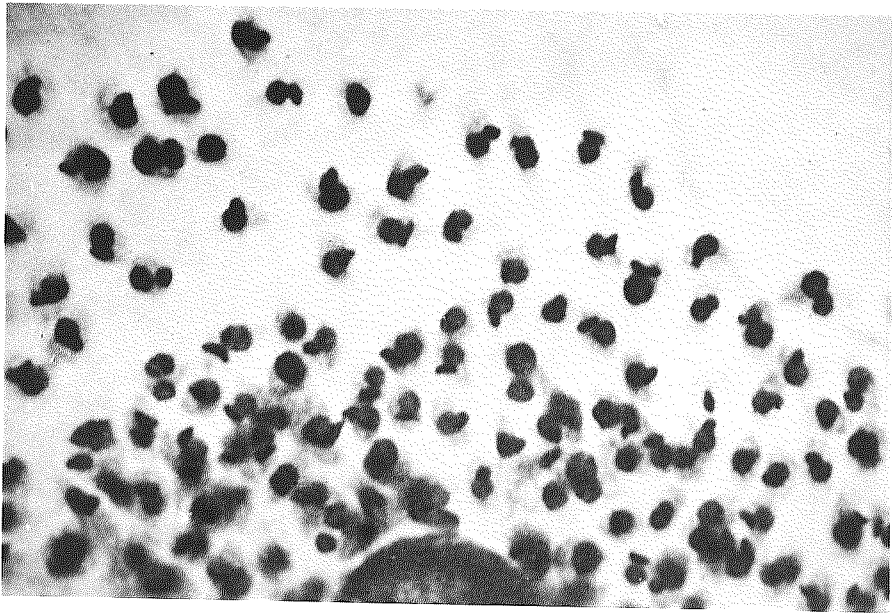
#### Prevención y control.-

El control de los vectores es un método efectivo para la reducción de la incidencia de la infección. En Brasil, los esfuerzos para el control han sido recompensados con notables éxitos. Un estudio seroepidemiológico provee de información exacta sobre la frecuencia regional de la enfermedad de Chagas; a nivel nacional afecta alrededor de 6 millones de personas. El gobierno organizó a los niños de las escuelas para recoger chinches reduídas, las cuales fueron entregadas a las autoridades sanitarias para su destrucción. Esta campaña condujo a la reducción de las proporciones de infección del 20% a menos del 5%

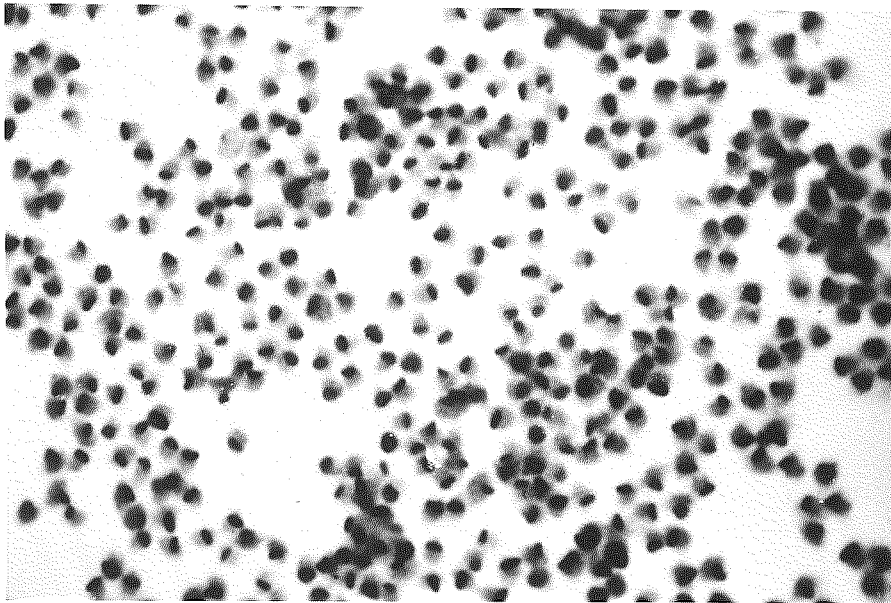
en un periodo de dos años (KATZ y col., 1982). La urbanización, con la tendencia a la eliminación de las cabañas de techos de paja, también contribuye a la reducción de la infección.

Además, los receptores de sangre pueden ser protegidos de la infección por tratamiento de la sangre donada con violeta de genciana (en una dilución 1:4000), el cual mata a los tripomastigotes (BRENER, 1979).

No existe quimioprofilaxis.

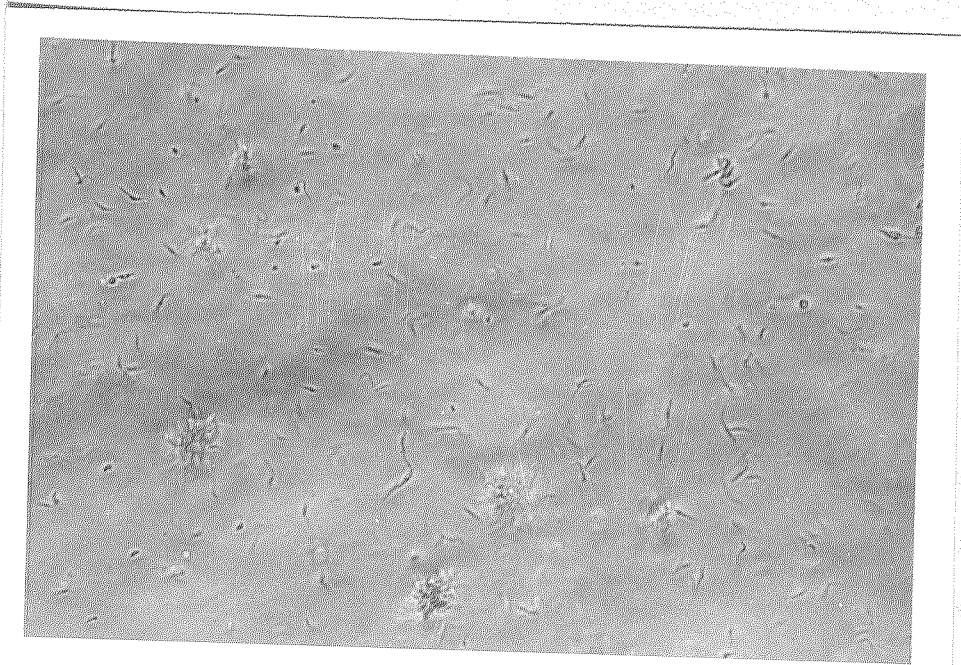


Células infectadas con formas amastigotas de T. cruzi en su interior.

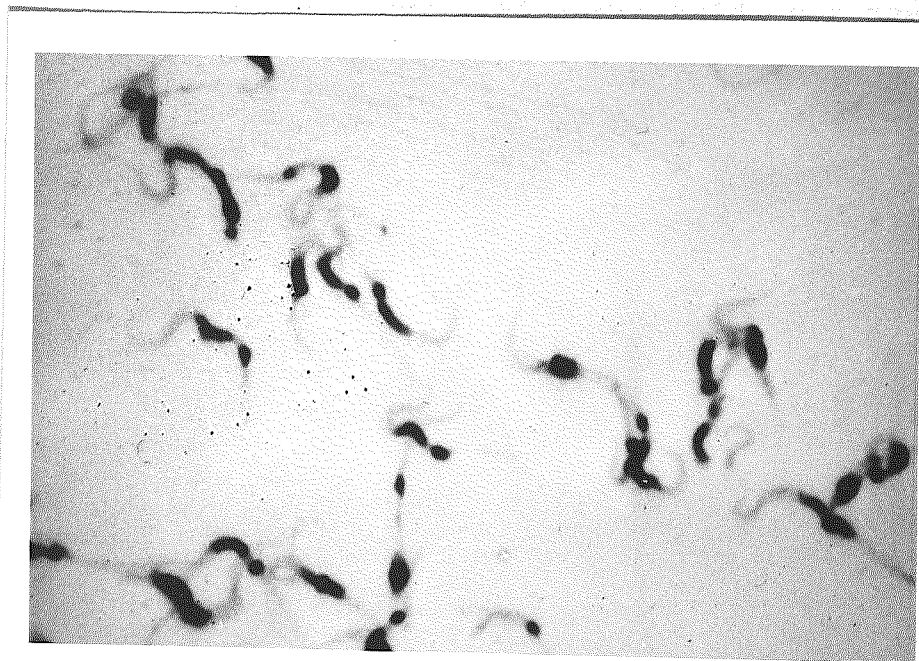


Formas amastigotas obtenidas de células Vero.





Roseta de crecimiento, típica de epimastigotes de T. cruzi.



Formas metacíclicas de T. cruzi.

### 3.1.1.1.- Mantenimiento del parásito en nuestro laboratorio.

Los trabajos experimentales realizados en la presente Tesis, han sido llevados a cabo con una cepa de Trypanosoma cruzi procedente de un caso humano y donada en 1972 a nuestro laboratorio por el Doctor Zozaya (División de Malariología y Sanidad Ambiental de Maracay, Venezuela). Esta cepa ha sido mantenida, desde entonces, por pases sucesivos, cada diez días, aproximadamente, en medio sólido NNN suplementado con una fase líquida de MEM + 20% de suero bovino fetal inactivado por calor (SBFI).

#### Medio de cultivo.-

El medio NNN está constituido por agar nutritivo, triptosa, cloruro sódico y sangre fresca de conejo inactivada por calor (apartado 3.4). Los componentes de este medio, a excepción de la sangre, son disueltos en agua bidestilada y esterilizados al autoclave durante 20 minutos a 120°C. Tras ello, el frasco que contiene el medio se lleva a un baño de maría termorregulado a 45°C, donde se deja enfriar hasta alcanzar dicha temperatura.

La sangre de conejo se obtiene por punción de la vena marginal de la oreja del animal, a la que previamente

se le ha aplicado xileno, para producir una vasodilatación local, y alcohol de 70°, para desinfectar la zona. La extracción de la sangre se realiza mediante un sistema Vacutainer, con EDTA disódico, como anticoagulante. La sangre así obtenida, es sometida a una ligera agitación e inactivada en un baño de maría termorregulado a 56°C durante 30 minutos. Este proceso ha de realizarse estérilmente.

Inactivada la sangre, se mezcla con la solución de los demás componentes del medio, que se encuentran a 45°C, se agita y se reparte en los distintos frascos de cultivo, los que posteriormente son incubados a 37°C durante 48 horas para comprobar su esterilidad. Confirmada ésta, se guardan a 4°C hasta el momento de su uso, no debiendo sobrepasar los 14 días de almacenaje.

La fase líquida del medio la constituye el medio MEM enriquecido con un 20% (v/v) de SBF1, a los que se añaden penicilina G sódica, sulfato de estreptomycinina y sulfato de kanamicina (apartado 3.4), con objeto de evitar las posibles contaminaciones por bacterias, tanto gram positivas como gram negativas, así como por micoplasmas. Tras agitación para disolución de los compuestos adicionados, se ajusta el pH a 7,2.

A continuación, este medio es esterilizado por filtración del modo que se indica en el apartado 3.14.

Cultivo.-

Una vez obtenidas por centrifugación las formas epimastigotas de un cultivo anterior y resuspendidas en medio MEM + 20% de SBFI, se calcula el número de parásitos mediante recuento en una cámara hemocitométrica de Neubauer, concentrando o diluyendo con dicho medio hasta que este número sea de  $1,5 \times 10^6$  tripanosomas/ml, inoculándose posteriormente 10 ml de esta suspensión sobre medio NNN (50 ml) de mantenimiento e incubándose a 28°C.

Los protozoos procedentes de estos cultivos son contados diariamente, para conocer en qué fase de crecimiento se encuentran.

Hacia los 10 días de cultivo, termina la fase logarítmica de crecimiento, iniciándose la fase estacionaria, en la que aparecen algunas formas metacíclicas (nunca más del 10%), siendo el resto formas epimastigotas de cultivo.

Cuando el cultivo llega a este punto, se retira la fase líquida y se centrifuga a 2000 x g durante 10 minutos. El botón de parásitos obtenidos, es sembrado en

otro frasco conteniendo medio NNN recién preparado, previa resuspensión en la fase líquida y ajuste del número de flagelados/ml adecuado. Estos frascos son de vidrio borosilicado de alta pureza y tienen una capacidad de 700 cc, llevando 50 ml de medio NNN y 10 ml de fase líquida (MEM + 20% de SBFI).

### 3.1.2.- EL VECTOR: Rhodnius prolixus.

Igualmente, hemos mantenido en nuestro laboratorio una población de Rhodnius prolixus, cepa Maracay. Estos redúvidos nos fueron cedidos en 1976 por el Doctor Blásquez, del Instituto Nacional de Virología de Majadahonda, Madrid.

Desde entonces se mantuvieron en cámara climática, a 28°C, y se alimentaron sobre conejos, hasta que murieron todos los individuos por causas accidentales en 1982, no pudiendo conseguir nuevos ejemplares de Sudamérica.

Rhodnius prolixus es un insecto del orden Hemiptera, de la familia Reduviidae, subfamilia Triatominae, el cual es vector natural de Trypanosoma cruzi y de T. rangeli, aunque experimentalmente se ha comprobado que puede ser parasitado por otros kinetoplástidos de los géneros Crithidia y Blastocrithidia, así como por T. conorhini. De estos parásitos sólo transmite al hombre los dos primeros. T. rangeli puede producir la muerte de R. prolixus por las lesiones que le produce, no siendo peligroso para el hombre, el cual actúa como reservorio junto con otros

mamíferos (REY, 1973). En cambio con T. cruzi ocurre al contrario (BARRETT, 1976).

Este hemíptero se encuentra distribuido por diversos países de América (México, Guatemala, Nicaragua, Panamá, Venezuela, Guayana Francesa, Guyana y Surinam), siendo su hábitat tanto doméstico como selvático, suponiendo ello un gran problema para su control, ya que además se ha observado intercambio de individuos entre estos dos ecotopos (MILES, 1976).

Es interesante indicar que existen artrópodos, tanto arácnidos como insectos, depredadores de huevos, larvas e, incluso, adultos de Triatominae, ello podría en un futuro permitir un control biológico de estos reducidos transmisores de T. cruzi. En lo que se refiere a R. prolixus, se ha encontrado en Venezuela un himenóptero depredador (Tapinoma melanocephalum) que, al menos experimentalmente, controla la población de este reducido. (BARRETT, 1976).

### 3.1.3.- CELULAS VERO

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

La línea celular Vero se estableció a partir de riñón de mono verde africano, Cercopithecus aethiops, en 1962 por YASUMURA y KAWAKITA de la Universidad de Chiba, Japón. Esta línea celular ha sido extensivamente empleada en estudios de replicación de virus (SV-40, SV-5, arbovirus, reovirus y polivirus).

Las utilizadas en nuestras experiencias provienen de una cepa mantenida en los laboratorios Flow y donadas a nuestro centro por el Departamento de Microbiología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Granada, en el año 1982, a partir del cual se mantienen en nuestro laboratorio.

#### 3.1.3.1.- Mantenimiento de células Vero en nuestro laboratorio.

Partimos de cultivos en monocapa que son separados estérilmente con el fin de que las células se despe-



guen del sustrato sobre el que están adheridas. Para ello, una vez retirado el medio de cultivo celular, se añaden 5 ml de una solución de EDTA (apartado 3.4.), dejándose en contacto con las células 1 minuto a temperatura ambiente. Posteriormente, se retira esta solución y los frascos se llevan a un incubador automático de CO<sub>2</sub> (Assab) regulado a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>, durante 10 minutos.

La pequeña cantidad de solución de EDTA retenida por la monocapa celular, actúa sobre ésta durante el tiempo de incubación. Al final de este periodo, se comprueba, por observación al microscopio de contraste de fase, si las células se han despegado de la superficie del frasco en el que estaban adheridas. En caso de ser así, se añade 5 ml del medio de cultivo y se agita muy bien la suspensión para que de esta forma las células se repartan uniformemente en el mismo.

A continuación, tras contar el número de células por ml y calcular la viabilidad, mediante tinción con el colorante vital azul tripán, se ajusta a  $1 \times 10^5$  células por ml, inoculándose 1 ml de esta suspensión en cada frasco, completando hasta 5 ml con medio de cultivo fresco.

Seguidamente, los frascos son llevados al incu-

bador automático de CO<sub>2</sub> a las condiciones anteriormente indicadas.

Aproximadamente a las 6 horas de cultivo, las células comienzan a adherirse al frasco y multiplicarse hasta formar una monocapa. Cada 48 horas se retira el medio y se adiciona, de nuevo, 5 ml de medio fresco. Se procede a realizar subcultivos cada 8 días, aproximadamente.

### 3.2.- CULTIVO "IN VITRO" DE Trypanosoma cruzi.

#### 3.2.1.- OBTENCION DE FORMAS EPIMASTIGOTAS DE CULTIVO.

Los cultivos se realizaron en 100 ml de medio BONE y PARENT (1963) (apartado 3.4.) que una vez esterilizado por filtración se coloca en frascos de cultivo de vidrio borosilicado de 700 cc de capacidad.

Las formas epimastigotas de Trypanosoma cruzi utilizadas en nuestras experiencias se han obtenido como se indica en el apartado 3.1.1.1.

El cultivo se mantiene en incubador a 28°C. Diariamente se calcula el número de parásitos/ml por recuento de una muestra del cultivo, recogida tras agitación del mismo, en cámara hemocitométrica de Neubauer, a fin de conocer en qué momento de la curva de crecimiento se encuentra.

Aproximadamente a los 8 días de cultivo, cuando hay una concentración de  $20 \times 10^6$  organismos/ml, se procede a su recolección. Esta se realiza por centrifugación del medio con los parásitos a 3000 x g durante 20 minutos.

A continuación, el botón se resuspende en solución de PBS (apartado 3.4.) y es nuevamente centrifugado a 3000 x g durante 20 minutos, repitiéndose esta operación de lavado nuevamente.

### 3.2.2.- OBTENCION DE FORMAS METACICLICAS DE CULTIVO.

Para cada cultivo se preparan 100 ml de medio de GRACE (1962) modificado por OSUNA y col. (1979) (apartado 3.4.) que contiene 90 ml de Grace's Insect Medium y 10 ml de SBFI. Una vez mezclado, el pH se bajó hasta 1,5 añadiendo ClH 1 N y, seguidamente, se ajustó a 5,8 con NaOH 1 N.

Una vez esterilizado el medio por filtración, fue almacenado en frasco estéril de 700 cc de capacidad, inoculándose a continuación formas epimastigotas obtenidas como se indica en el apartado 3.1.1.1.

Tras agitación, el medio inoculado se repartió en tubos Leighton (Bellco) previamente esterilizados, de 17 cc de capacidad, añadiéndosele a cada uno 2 ml de medio. Los tubos se colocaron en incubador a 28°C. Durante el transcurso del cultivo y tras agitación del mismo,

fue determinado el número de flagelados/ml por recuento en cámara hemocitométrica de Neubauer y el porcentaje de formas metacíclicas, que se calculó por tinción de una gota del medio homogenizado con Giemsa al 10%.

Aproximadamente a los 9 días de cultivo cuando existía un porcentaje de formas metacíclicas superior al 70% se procedió a la recolección de los flagelados crecidos en el mismo.

Esto se realizó por centrifugación del medio de cultivo con los parásitos a 3000 x g durante 20 minutos. A continuación, el botón se resuspendió en solución PBS (apartado 3.4.), siendo nuevamente centrifugado a las mismas condiciones, repitiéndose nuevamente la operación de lavado.

Tanto para la obtención de formas epimastigotas como para las metacíclicas, el inóculo lo constituyeron las formas epimastigotas procedentes del medio de mantenimiento (apartado 3.1.1.1.). Recogidas éstas al final de la fase exponencial de crecimiento, fueron colocadas en tubos "sterilines", dejándose reposar por un mínimo de 2

horas a 28°C, al objeto de que las formas muertas o con poca actividad, así como los restos de medio sólido, se depositen en el fondo cónico del tubo, quedando en la parte superior las formas más activas. Este sobrenadante fue centrifugado a 3000 x g durante 20 minutos.

El botón de flagelados obtenidos fue resuspendido en solución PBS y lavado por centrifugación a 3000 x g durante 20 minutos. El botón final se resuspendió en el medio de cultivo oportuno y se inoculó en los frascos de cultivo idóneos, para obtener una concentración final de  $1 \times 10^6$  tripanosomas/ml.

### 3.2.3.- OBTENCION DE FORMAS AMASTIGOTAS DE CULTIVO DE CELULAS VERO.

Las formas amastigotas intracelulares de Trypanosoma cruzi se obtuvieron a partir de cultivo de células Vero, mantenidos en frascos Roux (Nunc) de 25 cm<sup>2</sup> de superficie, en medio MEM + 20% de SBFI, e infectados con formas metacíclicas obtenidas como se indica en el apartado 3.2.2.

La relación metacíclico--célula mantenida fue de 10:1 y el tiempo de contacto de 12 horas a 37°C en atmósfera húmeda enriquecida con un 5% de CO<sub>2</sub>.

Transcurrido el periodo de interacción, y tras un exhaustivo lavado con solución de Hanks (apartado 3.4.) los cultivos celulares se dejaron incubar en medio MEM + 20% de SBFI, a 37°C en atmósfera húmeda con un 5% de CO<sub>2</sub> durante 8 días. Cada 48 horas el medio de cultivo fue renovado, adicionándosele medio fresco.

A los 8 días de incubación se observaron formas amastigotas en el sobrenadante, procedentes de las células Vero que estallaban liberándolas, recogién dose el sobrenadante y centrifugándose a 1000 x g durante 10 minutos, lavándose con solución PBS y resuspendiéndose los parásitos en medio CMRL-1066 sin glutamina (Gibco).

El bajo crecimiento de T. cruzi en metacíclicos, a la ausencia de SBFI

### 3.2.4.- PREPARACION DE MEDIOS DE CULTIVO GRACE MODIFICADOS.

La primera experiencia a realizar fue determinar el inóculo adecuado para obtener el máximo de metaciclógenesis. Para ello, se hizo una prueba en la que se sembraron epimastigotes de Trypanosoma cruzi en medio Grace (Gibco) + 10% de SBFI (Gibco), a pH 6,3, con distintos inóculos desde 250000 a 2500000 organismos/ml, obteniéndose los mejores resultados de transformación entre  $0,5$  y  $1,5 \times 10^6$  tripanosomas/ml. Por ello, se escogió como inóculo a utilizar  $1 \times 10^6$  flagelados/ml.

Igualmente, para determinar la influencia de las vitaminas en la diferenciación se ensayaron, en medio GRACE (1962) preparado en nuestro laboratorio (apartado 3.4.), todas las combinaciones posibles con tiamina, pantotenato cálcico y ácido fólico y se substituyó el 10% de SBFI por albúmina de suero bovino (Sigma), a una concentración de 2 mg/ml, para que no interfirieran las vitaminas presentes en el suero. Estos cultivos tuvieron en común el bajo crecimiento de T. cruzi en los mismos, debido, probablemente, a la ausencia de SBFI, portador de



múltiples factores de crecimiento. Por ello, se decidió en adelante usar SBF1 en todos los medios de cultivo. El pH de estos medios fue de 5,6.

Se emplearon frascos de cultivo Leighton de 17 cc de capacidad y con 2 ml de medio. La incubación se realizó a 28°C.

Se inocularon  $1 \times 10^6$  organismos/ml, siguiéndose se el crecimiento y la diferenciación los días 0, 3, 6, 8, 10 y 12 de cultivo. El crecimiento se siguió por recuento en cámara hemocitométrica de Neubauer y la transformación por tinción, recontando un mínimo de 400 organismos.

Para observar la morfología de los parásitos, se depositaba una gota del cultivo, previa y vigorosamente agitado, sobre un portaobjetos, dejándose secar a temperatura ambiente, fijándose seguidamente con metanol durante 30 segundos y tiñiéndose durante 15 minutos con una solución de Giemsa al 10% en tampón fosfato pH 7,2. Seguidamente se observaba la preparación al microscopio óptico, con el objetivo de inmersión.

El inóculo lo constituyeron formas epimastigotas obtenidas como se indica en los apartados 3.1.1.1. y 3.2.2.

Se ha trabajado con cuatro grupos de medios:

Grupo A:

Se utilizó medio Grace comercial suplementado con 10% de SBF1. Seguidamente se calculó el ClH necesario para llevar el medio a pH 1,5 y la cantidad de NaOH para llevarlo a pH 5,8. Al adicionar al medio original dicha cantidad de NaOH, el pH sube hasta 11,3. Conociendo esto, se prepararon los medios siguientes:

<u>Medio</u>	<u>Tratamiento</u>
P1 (a)	Con ClH hasta pH 1,5 y NaOH hasta pH 5,8
P2	Con NaOH hasta pH 11,3 y ClH hasta pH 5,8
P3	Con ClH hasta pH 1,5, mantenido durante 18 h a 28°C antes de ajustarlo a pH 5,8 con NaOH
P4	Con NaOH hasta pH 11,3, mantenido durante 18 h a 28°C antes de ajustarlo a pH 5,8 con ClH
P5	Con ClH hasta pH 1,5 y KOH hasta pH 5,8

---

(a) Medio Grace modificado por OSUNA y col. (1979), que actua como control.

Grupo B:

Se partió de medio Grace comercial (Gibco) suplementado con 10% de SBFI, al que se añadió cloruro sódico, cloruro potásico, sulfato magnésico, sorbitol o sacarosa, según el caso, a las siguientes concentraciones:

<u>Medio</u>	<u>Producto adicionado</u>	<u>Concentración final</u>
G0	---	---
G1	ClNa	50 meq/l
G2	ClNa	100 meq/l
G3	ClNa	150 meq/l
G4	ClK	50 meq/l
G5	SO <sub>4</sub> Mg	50 meq/l
G6	sorbitol	0,1 M
G7	sorbitol	0,2 M
G8	sorbitol	0,3 M
G9	sacarosa	0,1 M

Siendo el pH final de los medios 6,2-6,4.

Grupo C:

El medio GRACE (1962) fue preparado en nuestro laboratorio (apartado 3.4.) y, en cada caso, privado del componente o componentes cuyo efecto queríamos estudiar. Así, se han obtenido 17 medios, incluido el control el cual se corresponde con el medio completo.

a) Subgrupo vitaminas

<u>Medio</u>	<u>Característica</u>
GPO	Completo
GPT	Sin tiamina
GPF	Sin ácido fólico
GPP	Sin D-pantotenato cálcico
GPR	Sin riboflabina
GNP	Sin ácido nicotínico
GPOv	Sin cloruro de colina, i-inositol, PABA, piridoxina y biotina

b) Subgrupo aminoácidos

<u>Medio</u>	<u>Característica</u>
GPO	Completo
GPMet	Sin metionina
GP6	Sin glutamina, asparragina, serina ni arginina

GP4                      GP6 sin triptófano ni treonina

c) Subgrupo azúcares y ácidos orgánicos

<u>Medio</u>	<u>Característica</u>
GP0	Completo
GP1	Sólo 20 mg/ml de sacarosa
GP3	Sin ácidos málico, D-succínico, fumárico y alfa-cetoglutárico
GP5	Sin glucosa no fructosa
GP2	GP5 sin tiamina
GP2A	GP2 con 90 nM de (I)
GP2B	GP2 con 90 nM de (II)
GP2C	GP2 con 90 nM de (I) y 90 nM de (II)

En todos los casos los medios fueron suplementados con un 10% de SBFI y el pH final de los mismos fue 5,6.

El medio GRACE (1962) + 10% de SBFI lleva aproximadamente 90 nM de tiamina. Por ello, se utiliza esta concentración para los grupos tiazólico y pirimidínico, productos de la hidrólisis de esta vitamina, en los medios GP2A, GP2B y GP2C, carentes de tiamina.

---

(II) 4-metil-5-hidroxi-etil-tiazol

(I) ácido 2-metil-4-amino-pirimidín-5-metilsulfónico

Grupo D:

El medio GRACE (1962) fue preparado en nuestro laboratorio (apartado 3.4.) con las siguientes características:

<u>Medio</u>	<u>Característica</u>
GP0	Completo
GP0 ClNa <sup>4</sup>	Adicionado con 100 meq ClNa/1
GP5	Sin glucosa ni fructosa
GP5 ClNa <sup>4</sup>	GP5 adicionado con 100 meq ClNa/1

En todos los casos los medios fueron suplementados con un 10% de SBFI y el pH final de los mismos fue 6,2-6,4.

En este último grupo se combinan los medios que mejores resultados nos han dado.

Los productos I y II fueron suministrados por el Doctor M. F. Braña de la Universidad Autónoma de Madrid.

### 3.2.4.1.- Análisis de los resultados

Los resultados obtenidos con los medios Grace modificados estudiados fueron sometidos a un doble estudio estadístico.

Primeramente se realizó un análisis de varianza simple independientemente por grupos y subgrupos. Una vez detectada la no uniformidad de comportamiento dentro de los mismos, se procedió a realizar la comparación de cada uno de los medios investigados con el control de su grupo o subgrupo, utilizando para ello el test de la "t" de Student.

Los resultados de este test se muestran en los cuadros correspondientes de la sección de Resultados.

### 3.3.- ESTUDIO DE LAS POSIBLES MODIFICACIONES INDUCIDAS EN EL MEDIO GRACE (1962).

Con el fin de averiguar qué producto del medio de cultivo para la obtención de formas metacíclicas de Trypanosoma cruzi (medio Grace modificado de OSUNA y col. 1979) podía alterarse por el cambio de pH efectuado, se procedió a preparar en nuestro laboratorio medio GRACE (1962) + 10% de SBFI y a someterlo a un cambio de pH similar.

Se prepararon por separado las sales, ácidos orgánicos, aminoácidos, azúcares y vitaminas que entran a formar parte en la composición de este medio (apartado 3.4.). El pH de cada uno de estos grupos se bajó a 1,5, ajustándose posteriormente a 5,8. A igual proceso de cambio de pH fue sometido el SBFI.

Como consecuencia de su bajo o nulo poder tamp<sub>o</sub>nante, los azúcares sufrieron numerosos altibajos de pH antes de conseguir que el pH final de la solución fuese próximo a 5,8.

Seguidamente, se preparó medio Grace mezclando



las soluciones de cada grupo de compuestos sin tratar, que actuó como control, y diferentes medios Grace con uno de los grupos tratados pero con el resto de los componentes sin tratar. En todos los casos se empleó SBFI tratado, ya que tiene prácticamente todos los componentes del medio, aparte de otros, y ello podría influir negativamente si sólo alteráramos el componente del medio pero no el del suero. El pH final de los medios osciló entre 5,6 y 5,7.

Tras inocular y cultivar en las condiciones que se indican en el apartado 3.2.2. se siguieron los cultivos por recuento del número de flagelados/ml en cámara hemocitométrica de Neubauer y el porcentaje de formas metacíclicas por tinción Giemsa de una gota del medio.

Los mejores resultados, con diferencia con respecto a los demás, se obtuvieron en el medio Grace que llevaba el grupo de los azúcares tratados y los demás sin tratar, excepto el SBFI.

### 3.3.1.- ESTUDIO DE LAS MODIFICACIONES EN AZUCARES.

Por los resultados obtenidos, se pensó en la posibilidad de que algún azúcar, al estar sometido a concentraciones altas de ClH y de NaOH, pudiera haberse alterado, por lo que se procedió a investigarlo por cromatografía líquida de alta presión (HPLC).

Para ello, se prepararon muestras de glucosa, fructosa y sacarosa, así como una con los tres azúcares, en solución acuosa a la concentración en que se encuentran en el medio GRACE (1962) (apartado 3.4.). Una parte alícuota de estas muestras fue tratada con el cambio de pH acostumbrado.

Para el análisis de las muestras, se tomaron 15  $\mu$ l de las mismas y se inyectaron en el cromatógrafo líquido de alta presión (Waters) provisto de columna para carbohidratos (3,9 mm de diámetro interior x 30 cm de longitud) utilizando como eluyente CNMe:H<sub>2</sub>O (80:20) en flujo de 1,7 ml/min (unos 800 psi). La atenuación del aparato fue de 16 y el detector se basa en el índice de refracción para reconocer las sustancias.

### 3.3.2.- ESTUDIO DE LAS MODIFICACIONES EN AMINOACIDOS.

Por otra parte, con el fin de determinar si algún o algunos aminoácidos se habían alterado al sufrir el cambio de pH a que se somete el medio Grace modificado de OSUNA y col.(1979), se procedió a determinar los aminoácidos del medio Grace, del SBFI y del medio Grace + 10% de SBFI, antes y después de haber sido sometidos al cambio de pH prescrito para el citado medio.

Este estudio se realiza en base a que en el medio modificado de OSUNA y col. (1979) aparece mucho más amonio (apartado 3.7.2.) que en el original sin modificar.

Para la determinación de los aminoácidos se toman las muestras pertinentes y se tratan con un desproteinizante (ácido tricloroacético al 10%). Seguidamente se centrifugan las muestras eliminando las proteínas precipitadas y el sobrenadante, una vez neutralizado, es diluido con una solución de ácido sulfosalicílico (14,56 g/l), con 20 nmoles/ml de norleucina, como patrón interno, hasta obtener una dilución 1/15 del SBFI y del SBFI tratado y una dilución 1/75 de las muestras de Grace y Grace + 10% de SBFI tanto tratados como no tratados.

Estas muestras son procesadas en un aparato autoanalizador de aminoácidos Rank-Hilger Chromaspek J-180, recogién dose los resultados en un registrador acoplado a un integrador Hewlett-Pakard.

### 3.4.- SOLUCIONES Y MEDIOS EMPLEADOS.

#### Medio BONE y PARENT (1963)

Triptosa (Difco)	15000 mg
Glucosa (Riedel de Häen)	2000 mg
ClNa (Probus)	4000 mg
ClK (Riedel)	400 mg
PO <sub>4</sub> HNa <sub>2</sub> .12H <sub>2</sub> O (Probus)	5000 mg
Estearato sódico (BDH)	25 mg
Tiamina.HCl (Sigma)	1 mg
Ácido fólico (Sigma)	3 mg
Hemina (Sigma), (2 mg en 1 ml de etanol + 1 ml de NaOH, 25 mM)	20 ml
Agua bidestilada	930 ml
SBFI (Gibco)	50 ml
pH final del medio 7,6	

#### Medio de GRACE (1962)

PO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> Na.H <sub>2</sub> O (Probus)	1013 mg
ClK (Riedel)	2240 mg
Cl <sub>2</sub> Ca.2H <sub>2</sub> O (Merck)	1325 mg
Cl <sub>2</sub> Mg. 6H <sub>2</sub> O (Riedel)	2280 mg
SO <sub>4</sub> Mg.7H <sub>2</sub> O (Riedel)	2780 mg
CO <sub>3</sub> HNa (Merck)	350 mg

L-arginina.HCl (Sigma)	700 mg
Ácido L-aspártico (Sigma)	350 mg
L-asparragina (Sigma)	350 mg
L-alanina (Sigma)	225 mg
Beta-alanina (Merck)	200 mg
L-cistina (Sigma)	22 mg
Acido L-glutámico (Sigma)	600 mg
L-glutamina (Sigma)	600 mg
Glicina (Sigma)	650 mg
L-histidina (Merck)	2500 mg
L-isoleucina (Sigma)	50 mg
L-leucina (Sigma)	75 mg
L-lisina.HCl (Sigma)	625 mg
L-metionina (Sigma)	50 mg
L-prolina (Sigma)	350 mg
L-fenilalanina (Sigma)	150 mg
DL-serina (Sigma)	1100 mg
L-tirosina (Sigma)	50 mg
L-triptófano (Sigma)	100 mg
L-treonina (Sigma)	175 mg
L-valina (Sigma)	100 mg
Sacarosa (Merck)	26680 mg
Fructosa (BDH)	400 mg

Glucosa (Riedel)	700 mg
Acido málico (Riedel)	670 mg
Acido alfa-cetoglutárico (Sigma)	370 mg
Acido D-succínico (Sigma)	60 mg
Acido fumárico (Merck)	55 mg
Tiamina.HCl (Sigma)	0,02 mg
Riboflavina (Sigma)	0,02 mg
D-pantotenato cálcico (Sigma)	0,02 mg
Piridoxina.HCl (Sigma)	0,02 mg
Acido para-aminobenzoico (Sigma)	0,02 mg
Acido fólico (Sigma)	0,02 mg
Niazina (Sigma)	0,02 mg
i-inositol (Sigma)	0,02 mg
Biotina (Sigma)	0,01 mg
ColinaCl (Merck)	0,20 mg
Agua bidestilada	900 ml
SBFI (Gibco)	100 ml

pH final del medio 5,6

Medio Grace modificado de OSUNA y col. (1979)

Grace's Insect T.C. Medium sin hemolinfa

y con L-glutamina (Gibco)	90 ml
SBFI (Gibco)	10 ml

El pH es bajado con ClH hasta 1,5 y elevado, posteriormente, hasta pH final 5,8 con NaOH.

Medio MEM.

MEM (Eagle) (10x) con sales de Earle y con L-glutamina, sin $\text{CO}_3\text{HNa}$ (Gibco)	80 ml
Agua bidestilada	720 ml
$\text{CO}_3\text{HNa}$ (Merck)	1200 mg
HEPES (Sigma)	4000 mg
Penicilina G sódica (Antibióticos S.A.)	56 mg
Estreptomycin $\text{SO}_4$ (Antibióticos S.A.)	100 mg
Kanamycin $\text{SO}_4$ (Bristol-Myers, SAE)	48 mg
SBFI (Gibco)	200 ml
pH final del medio 7,2	

Base sólida NNN

Agar nutritivo deshidratado (Difco)	1400 mg
ClNa (Probus)	600 mg
Triptosa (Difco)	500 mg
Agua bidestilada	95 ml
Sangre de conejo inactivada por calor a 56°C durante 30 minutos	5 ml



Solución EDTA

EDTA Na <sub>2</sub> (Merck)	200 mg
Glucosa (Riedel)	1000 mg
ClK (Riedel)	400 mg
ClNa (Probus)	8000 mg
CO <sub>3</sub> HNa (Merck)	580 mg
Agua bidestilada c.s.p.	1000 ml

pH final de la solución 7,2

Solución de Hanks

ClNa (Probus)	8000 mg
ClK (Riedel)	400 mg
Cl <sub>2</sub> Ca (Merck)	140 mg
SO <sub>4</sub> Mg.7H <sub>2</sub> O (Riedel)	200 mg
PO <sub>4</sub> HNa <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O (Merck)	60 mg
PO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> K (Riedel)	60 mg
Glucosa (Riedel)	1000 mg
CO <sub>3</sub> HNa (Merck)	350 mg
NeomicinaSO <sub>4</sub> (Acofarma)	100 mg
Rojo fenol (Riedel)	20 mg
Agua bidestilada c.s.p.	1000 ml

pH final de la solución 7,3

Solución PBS

ClNa (Probus)	8000 mg
ClK (Riedel)	200 mg
PO <sub>4</sub> HNa <sub>2</sub> (Probus)	1160 mg
PO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> K (Riedel)	160 mg
Agua bidestilada c.s.p.	1000 ml

pH final de la solución 7,2

Solución de Krebs-Henseleit

ClNa (Probus)	6923 mg
ClK (Riedel)	354 mg
Cl <sub>2</sub> Ca (Merck)	282 mg
PO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> K (Riedel)	162 mg
SO <sub>4</sub> Mg.7H <sub>2</sub> O (Riedel)	292 mg
Agua bidestilada c.s.p.	1000 ml
Gaseado durante 10 minutos con carbógeno (CO <sub>2</sub> + O <sub>2</sub> )	
CO <sub>3</sub> HNa (Merck)	2100 mg

pH final de la solución 7,2

### 3.5.- PREPARACION DEL EXTRACTO DE Rhodnius prolixus

Para la obtención de este extracto se selecciona 1 ejemplar adulto de Rhodnius prolixus, cepa Maracay, en ayuno de 30 días. Se introduce en un tubo de ensayo al que se adiciona 1 ml de tampón citrato 0,02 M, a pH 5,5, y se tritura en un homogenizador Ultra-Turrax (Ika-Werk), en baño de hielo.

El homogenado obtenido es sometido a la acción de un aparato disruptor por ultrasonidos MSE a 6 micrones de amplitud durante 30 segundos, en baño de hielo.

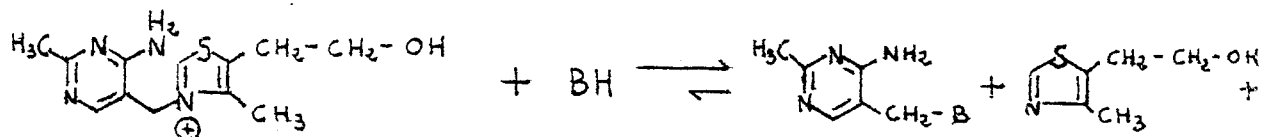
Seguidamente, el extracto es centrifugado a 14000 x g durante 30 minutos a 4°C, en una centrífuga refrigerada de alta velocidad Beckman J2-21M, con un rotor JA-20. El sobrenadante obtenido es utilizado para la determinación de tiaminasa, manteniéndose en baño de hielo hasta su uso, en un plazo no superior a 2 horas.

### 3.6.- DETERMINACION DE TIAMINASA

Para la determinación de la actividad tiaminasa en extracto de Rhodnius prolixus, se procede de dos formas:

#### 3.6.1.- DETERMINACION ESPECTROFOTOMETRICA DE TIAMINASA I

La tiaminasa I (E.C. 2.5.1.2) cataliza la descomposición de tiamina por una reacción con intercambio de bases que incluye un desplazamiento nucleofílico sobre el grupo metilénico de la mitad pirimidínica.



La actividad enzimática es determinada por la técnica de WITTLIFF y AIRTH (1970a), modificación del método de DOUTHIT y AIRTH (1966), en la que se emplea anilina como base en la reacción de intercambio. La formación del producto, N-(4-amino-2-metil-pirimidín-5-ilmetil)anilina, es medida espectrofotométricamente, por incremento de la absorbancia a 248 nm.

El procedimiento es el siguiente: a 0,6 ml de solución de anilina tamponada (anilina, recién destilada, a una concentración de 5,75 mM en tampón fosfato sódico 0,5 M, pH 5,8) en cubeta de 3 ml (1 cm de paso de luz) se añade agua bidestilada y el extracto hasta un volumen de 2,6 ml.

La mezcla sin el extracto se estabiliza a 25°C durante 10-12 minutos. A continuación se añade el extracto (0,4 mg de proteína, aproximadamente), equilibrando nuevamente a 25°C. Finalmente, se adicionan 0,4 ml de solución de tiamina 0,3 mM (0,04 mM en cubeta). El blanco es una mezcla de anilina, tampón y agua. Se hace un control con todos los reactivos y el extracto, previamente calentado a 100°C durante 10 minutos, o con sólo los reactivos. El cambio de densidad óptica a 248 nm, se mide durante 6 minutos en un espectrofotómetro Zeiss modelo PM2K, con cámara termostatizada a 25°C.

La actividad específica de la enzima se calcula conociendo la variación de la densidad óptica por minuto (DO/min) y la cantidad de proteína adicionada a cada cubeta, lo cual se determina por el método de LOWRY y col. (1951) (apartado 3.12.):

$$\text{Actividad específica} = \frac{(\text{DO/min}) \times (0,269)}{\text{mg proteína/cubeta}}$$

0,269 = Constante que convierte la absorbancia en  $\mu\text{moles}$  para una mezcla de reacción de 3 ml.

### 3.6.2.- DETERMINACION ESPECTROFLUOROMETRICA DE TIAMINA (Método indirecto)

Básicamente consiste en poner en contacto un medio con una concentración de tiamina conocida con el extracto y determinar espectrofluorométricamente, después de un periodo determinado, la cantidad de tiamina que queda en el medio.

Para ello, se siguió primeramente el método de FUJITA (1955) que usa Permutita, una resina intercambiadora de iones que adsorbe la tiamina, lo que permite su recuperación del medio y posterior medición. En nuestras experiencias se obtuvo un rendimiento del 55%, por lo que decidimos prescindir de esta técnica.

La técnica realizada por nosotros quedó como sigue: 2 ml de extracto de Rhodnius prolixus, conteniendo 2,75 mg de proteína, son adicionados a 8 ml de tampón citrato 0,02 M, pH 5,5, conteniendo una cantidad tal de

clorhidrato de tiamina que su concentración final sea de 5 µg/ml (o la que se haya de usar en cada caso). El blanco consistió en la misma solución anterior sin tiamina.

Se han hecho curvas de tiempo de reacción a 5, 4, 3, 2 y 1 horas, 40, 30, 20 y 10 minutos y 120, 90, 60, 50, 40, 30, 20 y 10 segundos y a tiempo cero.

Igualmente, se han hecho curvas de concentración de sustrato a 5, 1, 0,5, 0,1 y 0,05 µg de tiamina. HCl/ml, con un tiempo de reacción de 30 minutos.

Todas las pruebas se llevaron a cabo en baño de maría termostatzado a 37°C.

Una vez transcurrido el tiempo de reacción previsto, se procede inmediatamente a analizar el contenido de tiamina de cada ensayo por el método fluorométrico descrito en la USP XXI (1985): Se toman 2 ml de cada ensayo y se colocan en tubos a los que se añade 1,2 ml de solución de ferricianuro potásico (10 mg de ferricianuro potásico en 1 ml de agua bidestilada al que se añade 24 ml de NaOH, 3,5 N) agitando durante 30 segundos. Seguidamente, se adicionan 8 ml de isobutanol, agitando durante 90 segundos. Finalmente, se añaden 0,8 ml de etanol absoluto, mezclando y dejando decantar.

Una vez que el sobrenadante está claro, se pipetea a una cubeta de 3 ml (1 cm de paso de luz) y se mide su fluorescencia en un espectrofluorómetro Perkin-Elmer, modelo MPF-3K, utilizando una  $\lambda$  de excitación de 365-385 nm y una  $\lambda$  de emisión de 425-440 nm.

Este método se basa en la oxidación de la tiamina del medio por ferricianuro dando lugar a tiocromo, el cual es extraído con isobutanol y medida su fluorescencia frente a una curva estándar, realizada paralelamente, con concentraciones de tiamina.HCl de 0,05 a 5  $\mu\text{g}$  por ml, según los casos.



### 3.7.- DETERMINACION DE AMONIO EN AMASTIGOTES

Las formas amastigotas recogidas (apartado 3.2.3.) son resuspendidas en medio CMRL-1066 sin glutamina (Gibco) en una proporción de  $0,5 \times 10^8$  organismos/ml. Se utilizan matraces erlenmeyer de 25 ml de capacidad con tapón a rosca. En cada uno, se introducen 2 ml de medio con los amastigotes.

Estos matraces son colocados en un baño termostatizado Gallenkamp a 37°C en agitación lateral (70 ciclos/min) durante 24 horas, junto con un blanco de medio sin protozoos, en las mismas condiciones. Todo este proceso se realiza en condiciones de esterilidad. Finalmente, se toman alícuotas de medio blanco y problema, a los que se mide el amonio que contienen.

#### 3.7.1.- DETERMINACION DE AMONIO

La medida del amonio excretado al medio se realiza con la ayuda de un micrométodo adaptado por nosotros a partir del kit de amonio número 170-UV de Sigma.

La determinación se basa en la aminación reductora de alfa-cetoglutarato, usando glutamato deshidrogenasa y NADH. La reacción es dependiente de amonio. Las aminas metiladas, que interfieren en otros métodos, no reaccionan en éste. La reacción se sigue espectrofotométricamente a 340 nm por decrecimiento de la absorbancia, debido a la oxidación de NADH, el <sup>cu</sup>al es proporcional a la concentración de ión amonio de la muestra.

Para cada prueba se preparan 3 cubetas (blanco, control y problema). Se añade a cada una 1 ml de una solución tamponada que lleva 2 mM de alfa-cetoglutarato y 0,12 mM de NADH. Seguidamente, se adiciona 0,1 ml de agua al blanco, 0,1 ml de la solución patrón de amonio (5 µg/ml) al control y 0,1 ml de muestra al problema. Se mezcla y se deja equilibrar durante 5 minutos. A continuación, se mide la absorbancia inicial de cada cubeta a 340 nm, frente a agua como referencia.

Medida la densidad óptica, se procede a adicionar 7 µl de L-glutamato deshidrogenasa a cada cubeta. Se mezcla y se deja reaccionar durante 5 minutos, para seguidamente leer la extinción final frente a agua. El ensayo se realiza a una temperatura entre 25 y 37°C.

El agua utilizada como blanco, así como la empleada para las diluciones de las muestras de elevada concentración de amonio, debe estar libre del mismo, es decir, la variación de densidad óptica del blanco ha de ser inferior a 0,100 unidades de absorbancia, entre el inicio de la reacción y su final.

Cálculo:

A la diferencia de absorbancia, entre el estado inicial y el estado final de la reacción, del control y de la muestra se le resta la variación de densidad óptica del blanco y el resultado se multiplica por el factor 30,3 que nos dará los  $\mu\text{g}$  de amonio/ml contenidos en el control y en la muestra, respectivamente.

### 3.8.- DETERMINACION DE LA NATURALEZA DE LOS CRISTALES APARECIDOS EN LOS MEDIOS DE CULTIVO

Los cristales formados espontáneamente en cultivos viejos de Trypanosoma cruzi (24 días ó más), en medio Grace modificado (OSUNA y col., 1979) inoculados y cultivados en las condiciones indicadas en el apartado 3.2.2. son recogidos pasando estos medios a través de un filtro Sartorius de 8 micras de diámetro de poro, quedando los cristales retenidos en la superficie del mismo.

Este filtro, con los cristales, se somete a liofilización (liofilizador SB4) para evitar su posible redisolución, ya que desconocíamos su composición y propiedades.

Estos cristales se sometieron a una serie de pruebas físicas y químicas para conocer su identidad.

Así, unos pocos cristales se añadieron a 5 ml de agua bidestilada; tras agitación vigorosa, se comprobó su insolubilidad o muy baja solubilidad. Conociendo esta propiedad, los cristales se lavaron en agua bidestilada para eliminar los restos orgánicos que les acompañaban.

Tras este proceso, un grupo de estos cristales fueron sometidos a la acción de la llama de un mechero de gas, no siendo afectados, lo que indica su naturaleza inorgánica.

Para conocer sus propiedades ácidas o básicas, un papel de tornasol fue humedecido con agua bidestilada y sobre él se colocó un cristal, observándose de esta forma su carácter básico.

Al ser adicionados a una solución de  $\text{NO}_3\text{Ag}$ , dieron un precipitado de color amarillo, típico de fosfatos.

Al ser calentados con una solución de  $\text{NaOH}$ , desprendieron amoníaco, reconocible por su penetrante olor, indicando con ello que en su composición entra a formar parte el ión amonio.

Con estos datos previos, los cristales fueron estudiados al microscopio electrónico de barrido Philips 515 y analizados con un microanalizador "Edax" acoplado al mismo.

Al objeto de conocer la composición y estructura de estos cristales, fueron pulverizados en un mortero de ágata y sometidos a un análisis de difracción de rayos X, en un difractómetro Philips Pw 1730, en las si-

guientes condiciones: radiación Cu-K $\alpha$ , 30-40 kV, 30 mA, filtro de Ni, rendija de ventana 1°, rendija de contador 0,1°, velocidad de exploración 2°(2 $\theta$ )/min, constante de tiempo 1, rango  $4 \times 10^3$  y  $10^4$  cps.

A los medios de cultivo en que aparecían los cristales, se les medía el pH, así como la concentración de amonio disuelto (apartado 3.7.1.) y de glucosa (apartado 3.9), en el momento de la precipitación.

Para seguir la evolución de los cultivos, se procedió a preparar medio Grace + 10% de SBFI como control al que se añadió ClNa (100 meq/l) o sorbitol (0,2M) para producir una presión osmótica similar (550-575 mOsm) a la del medio Grace modificado (OSUNA y col., 1979), medida con un osmómetro automático (Osmette S, Precision Systems Inc.).

Estos medios fueron inoculados y cultivados en las condiciones indicadas en el apartado 3.2.2., siendo el pH de los mismos 6,2-6,4.

Se siguió el crecimiento por recuento en cámara hemocitométrica de Neubauer, el pH con un pHmetro Beckman 1350, la concentración de glucosa por el método de BERGMAYER y BERNT (1974) (apartado 3.9.) y la producción de amonio con el kit 170-UV de Sigma (apartado 3.7.1.)

los días 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12 y 24 de cultivo.

Se hacen cultivos paralelos, sin abrir los tubos, para tenerlos en las mismas condiciones que los cultivos viejos en los que precipitan cristales, donde se observará la precipitación de los mismos y la diferencia con los cultivos que se abre.

### 3.9.- DETERMINACION DE GLUCOSA

Se ha empleado el método descrito por BERGMAYER y BERNT (1974) en el que se utiliza la enzima glucosa oxidasa, que actúa oxidando la D-glucosa en ácido gluconico en presencia del oxígeno atmosférico, formándose además agua oxigenada, la cual por acción de la enzima peroxidasa se descompone liberando oxígeno que actúa sobre la orto-dianisidina reducida (leucobase) convirtiéndola en orto-dianisidina oxidada (cromobase) coloreada. Este color es proporcional a la cantidad de glucosa inicial de la muestra y es medido a 440 nm.

Aunque la glucosa oxidasa es una enzima específica de la beta-D-glucosa, al ir siempre acompañada de mutasa sirve para la determinación de toda la glucosa de la muestra.

En primer lugar, se prepara una solución de orto-dianisidina al 1% en etanol al 95%, la cual debe protegerse de la luz. Se renueva cada mes.

Seguidamente, se disuelven 3,6 mg de beta-D-glucosa (Sigma) en 100 ml de agua bidestilada, extemporáneamente. A partir de esta solución preparamos la cur-



va patrón diluyendo con agua bidestilada hasta obtener concentraciones de 90, 180, 270 y 360  $\mu\text{g/ml}$  de muestra.

A continuación, se prepara extemporáneamente la mezcla enzimática, que lleva 9,3 mg de glucosa oxidasa purificada (Sigma) y 3 mg de peroxidasa (Sigma) en 75 ml de tampón fosfato di-monosódico (0,2 M)-tris (0,1M)-ClH, pH 7,3, a la que se adiciona 0,5 ml de solución de orto-dianisidina.

El blanco se prepara con 1 ml de agua bidestilada. La muestra problema es de 1 ml, diluyéndose en el caso de que su concentración de glucosa sea excesivamente elevada.

A cada muestra (blanco, patrón, problema) se adiciona 2,5 ml de la mezcla enzimática y se agita, incubándose 1 hora a 37°C en baño de maría.

Transcurrido este tiempo, se procede a la lectura a 440 nm en Spectronic con filtro blanco, representando gráficamente la curva patrón y determinando, a partir de ella, la concentración de glucosa del problema.

### 3.10.- PRODUCCION DE $^{14}\text{CO}_2$ A PARTIR DE D-(U- $^{14}\text{C}$ )-GLUCOSA

Una vez recolectados los parásitos (apartados 3.2.1. y 3.2.2.), son nuevamente lavados en solución de Krebs-Henseleit (apartado 3.4.) y resuspendidos, seguidamente, en dicha solución a la que previamente se añade 10 mg/ml de albúmina de suero bovino (Sigma) y 10 mM de glucosa (Riedel), diluyéndose hasta obtener un número adecuado de tripanosomas/ml. Posteriormente, se le adiciona D-(U- $^{14}\text{C}$ )-glucosa (Radiochemical Center) en la proporción de 1  $\mu\text{Ci}/2$  ml.

A continuación, se toman matraces erlenmeyer de 25 cm<sup>3</sup> de capacidad en los que se introduce 2 ml de medio con tripanosomas. Los matraces se cierran con un tapón de goma, el cual lleva un papel de filtro (2 x 4 cm) arrollado e impregnado con 0,1 ml de KOH al 10% que queda colocado en el interior del matraz.

Los erlenmeyer son incubados a 28°C con movimiento de balanceo, para facilitar la reacción, durante 1 hora. Tras este tiempo, se detiene la reacción con 1 ml de alcohol metílico, que provoca la muerte instantánea.

nea de los tripanosomas sin actuar sobre la glucosa.

Se dejan durante 24 horas a 28°C para que el papel de filtro impregnado de potasa absorba todo el CO<sub>2</sub> desprendido durante la degradación de la glucosa llevada a cabo por los parásitos. Al cabo de este tiempo, los papeles de filtro se recogen y se depositan en los viales de centelleo líquido que contienen 15 ml de líquido de centelleo, cuya composición es la siguiente: 0,5 l de tolueno (Merck); 0,5 l de metanol (Riedel); 0,02 g/l de dimetil-POPOP (Sigma) y 2 g/l de PPO (Sigma).

En un contador de centelleo líquido (Beckman LS-7500) se mide la radioactividad en desintegraciones por minuto (dpm), para lo cual se prepara un blanco con 15 ml de líquido de centelleo con papel de filtro y otro sin él (como fondo).

Para el cálculo de los nmoles de <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> liberados/hora se procede de la forma siguiente:

1 μCi se corresponde con 2,2 x 10<sup>6</sup> dpm; 323 nmoles de la D-(U-<sup>14</sup>C)-glucosa empleada tienen una actividad de 1 μCi; cada nmol de glucosa se metaboliza en 6 nmoles de CO<sub>2</sub>.

Por lo tanto, el número de nmoles de  $^{14}\text{CO}_2$  producidos/hora/número de tripanosomas será igual a:

$$\frac{323 \times 6 \times \text{dpm}}{2,2 \times 10^6}$$

siendo dpm = dpm de la muestra - dpm del blanco.

### 3.11.- PREPARACION DE EXTRACTOS DE Trypanosoma cruzi

Una vez recolectados los parásitos (apartados 3.2.1. y 3.2.2.), son nuevamente lavados en solución isotónica de ClNa al 0,9% y resuspendidos en un volumen adecuado de tampón Tris-ClH, 10 mM, a pH 7,6. Posteriormente, son sometidos a la acción de los ultrasonidos en un sonicador MSE en las siguientes condiciones: 4 micrones, 30 segundos, 4 veces a intervalos de un minuto, manteniendo la muestra en baño de hielo.

Una vez obtenido el extracto, es centrifugado a 31000 x g a 2°C durante 30 minutos en un rotor JA-20 de una centrífuga refrigerada Beckman J2-21M. Se separan el botón y sobrenadante, pesándose el primero en una balanza Sartorius utilizándose para determinar la actividad succinato deshidrogenasa, mientras que el sobrenadante es utilizado para el resto de las determinaciones enzimáticas (apartado 3.13).

El botón es resuspendido, para su utilización, en un volumen adecuado de tampón fosfato, 10 mM, pH 7,2. Posteriormente, las soluciones de sobrenadante y botón son sometidas a una determinación de proteínas por el método de LOWRY y col. (1951) (apartado 3.12.).

### 3.12.- DETERMINACION DE PROTEINAS

Esta determinación es realizada por una adaptación del método de LOWRY y col. (1951) a muestras 5 veces menores que las analizadas por esta técnica. El método se basa en la asociación de las reacciones del biuret (reacción de los enlaces peptídicos) y de Folin (reactivo de la tirosina).

En primer lugar, se prepara la solución alcalina de cobre mezclando 50 ml de  $\text{CO}_3\text{Na}_2$  al 2% en sosa 0,1 N con 1 ml de solución de  $\text{SO}_4\text{Cu} \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  al 0,5% en tartrato sódico al 1%, extemporáneamente.

El reactivo diluido de Folin se prepara por dilución 1:1 del reactivo de Folin-Ciocalteou comercial (Panreac) con agua bidestilada.

La solución patrón de proteínas se prepara por disolución de 10 mg de albúmina de suero bovino (Sigma) en 10 ml de agua bidestilada, extemporáneamente. A partir de esta solución preparamos la curva patrón de proteína diluyendo con agua bidestilada hasta obtener concentraciones de 10, 20, 30 y 40  $\mu\text{g}$  de proteína por muestra de 200  $\mu\text{l}$ .

La muestra problema es de 200  $\mu$ l, diluyéndose en el caso de que su concentración proteica sea excesivamente elevada.

El blanco se hace con 200  $\mu$ l de agua bidestilada.

Seguidamente, se adiciona a cada muestra (blanco, patrón y problema) 1 ml de la solución alcalina de cobre, se mezcla y se deja reaccionar durante 15 minutos en baño de maría a 30°C.

A continuación se añaden 100  $\mu$ l de reactivo diluido de Folin y se mezcla inmediatamente, debido a su inestabilidad en medio alcalino, incubándose 20 minutos a 30°C, en baño de maría.

Transcurrido este tiempo, se procede a la lectura a 640 nm en espectrofotómetro (Zeiss PM2K), representando gráficamente la curva patrón y determinando, a partir de ella, la concentración proteica del problema.

### 3.13.- DETERMINACIONES ENZIMATICAS

En todas las experiencias realizadas, una vez pesados los componentes de la mezcla de reacción, excepto el sustrato, son disueltos en el tampón (5x) de la reacción, previamente preparado. El sustrato es disuelto aparte en agua bidestilada, haciéndose diluciones del mismo, si son necesarias.

Se trabaja en cubetas de plástico, microcubetas, de 1 cm de paso de luz. En todos los casos, las técnicas se han adaptado a un volumen final de 1 ml en cubeta.

En los casos que se emplean enzimas auxiliares, que se encuentran en suspensión en una solución de sulfato amónico 3,2 M (excepto láctico deshidrogenasa, que está en solución 2,1 M), éstos son previamente diluidos en 10 veces su volumen de agua bidestilada y colocados en tubos de diálisis (Serva, tipo 8/32). Seguidamente, son sometidos a dializado frente tampón Tris-ClH (10 mM) pH 7,5, durante, al menos, 8 horas a 4°C y en agitación continua, mediante agitador magnético. El dializado se adiciona a la mezcla disuelta en el tampón (5x).



Las cubetas, tras ser desengrasadas con alcohol etílico, son colocadas en la cámara termostatzada a 37°C del espectrofotómetro (Zeiss PM2K) añadiéndoles a continuación las cantidades apropiadas de agua bidestilada y mezcla en tampón (5x) y se sigue su absorbancia hasta la estabilización, a la longitud de onda adecuada. A continuación, se adiciona la cantidad de extracto pertinente, previa agitación del mismo, aguardándose hasta el equilibrio de su densidad óptica.

Finalmente, se añade el sustrato, con el que se inicia la reacción, la cual es seguida durante 5-10 minutos (según el caso). Para ello, se anota la variación de densidad óptica cada 30 segundos ó 1 minuto (según el caso) y es plasmada gráficamente en papel de registro, por un registrador Houston Instruments modelo OmniScribe.

En el caso de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, la reacción se inicia con el extracto, pues se obtienen mejores resultados que con el sustrato. Por ello, se prepara previamente un ciego sin sustrato, pero con el resto de la mezcla de la reacción, incluido el extracto, y se sigue espectrofotométricamente, siendo restado de los valores obtenidos en el resto de las cubetas.

### 3.13.1.- HEXOKINASA (E.C. 2.7.1.2)

Se ensayó por el método descrito por JOSHI y JAGNNATHAN (1966) en el que la mezcla de la reacción contiene:

20 mM de Tris-ClH, pH 7,5; 20 mM de Cl<sub>2</sub>Mg; 0,01 mM de EDTA; 0,13 mM de NADP; 1 mM de ATP; 0,2 U/ml de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa; aproximadamente 0,1 mg de proteína y una concentración de sustrato, D-glucosa, variable entre 0,01 mM y 15,0 mM.

La reacción se sigue espectrofotométricamente, a 340 nm, por aumento de la densidad óptica, por formación de NADPH. El coeficiente de extinción molar de éste, a 340 nm, es de  $6,22 \times 10^6 \text{ cm}^2/\text{mol}$ .

### 3.13.2.- FOSFOFRUCTOKINASA (E.C. 2.7.1.11)

Se determinó por una modificación de la técnica de LING y col. (1966) en la que la mezcla de la reacción contiene:

30 mM de Tris-ClH pH 8,0; 5 mM de SO<sub>4</sub>Mg; 50 mM de ClK; 1 mM de ditiotreitól; 2 mM de ATP; 2 mM de AMP;

25  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de aldolasa; 1 U/ml de fosfoglucoisomerasa; 0,25 mM de NADH; aproximadamente 0,1 mg de proteína del extracto y sustrato. Como sustrato se emplea glucosa-6-fosfato y fructosa-6-fosfato en la proporción 3:1, para garantizar un aporte continuo de sustrato (mediante la enzima fosfoglucoisomerasa), especialmente a bajas concentraciones. Estas oscilan entre 0,01 mM y 2,0 mM de fructosa-6-fosfato.

La reacción se sigue espectrofotométricamente por descenso de la absorbancia a 340 nm, por desaparición de NADH debido a la oxidación a NAD. El coeficiente de extinción molar del NADH, a 340 nm, es de  $6,22 \times 10^6 \text{ cm}^2/\text{mol}$ . Cada mol de fructosa-6-fosfato transformado da lugar a la desaparición de 2 moles de NADH.

### 3.13.3.- FRUCTOSA-1,6-BISFOSFATASA (E.C. 3.1.3.11)

Se determinó por una modificación del método de ROSEN y col. (1966). La mezcla de la reacción contiene:

30 mM de Tris-ClH, pH 7,2 (o en su caso, 40 mM de glicina-ClH, pH 9,5); 5 mM de  $\text{Cl}_2\text{Mg}$ ; 0,25 mM de NADP; 0,2 mM de EDTA; 0,6 U/ml de glucosa-6-fosfato deshidro-

genasa; 0,7 U/ml de fosfoglucoisomerasa; 0,25 mg de proteína del extracto, aproximadamente, y fructosa-1,6-bisfosfato en una concentración entre 0,005 mM y 0,25 mM.

La reacción se sigue espectrofotométricamente por incremento de la extinción a 340 nm por formación de NADPH, a 37°C (o en su caso, a 28°C).

#### 3.13.4.- PIRUVATO KINASA (E.C. 2.7.1.40)

Se ensayó por la técnica de VALENTINE y TANAKA (1966) en la que la mezcla de la reacción contiene:

8,33 mM de trietanolamina-ClH, pH 7,5; 75 mM de ClK; 8 mM de  $SO_4Mg$ ; 0,4 mM de ADP; 0,2 mM de NADH; 6 U/ml de lactato deshidrogenasa; aproximadamente 0,05 mg de proteína del extracto y sustrato, fosfoenolpiruvato, en una concentración de 0,1 mM a 10 mM.

La reacción se sigue espectrofotométricamente a 340 nm, por decrecimiento de la absorbancia debido a la oxidación de NADH a NAD.

### 3.13.5.- GLUCOSA-6-FOSFATO DESHIDROGENASA (E.C. 1.1.1.49)

Se midió por la técnica LOHR y WALLER (1965) desarrollada por COOMBS y col. (1982). La mezcla de la reacción contiene:

42 mM de trietanolamina-ClH, pH 7,5; 0,46 mM de NADP; 4,2 mM de EDTA; aproximadamente 0,07 mg de proteína y concentraciones de glucosa-6-fosfato entre 0,01 mM y 10 mM.

La reacción se inició por adición del extracto y se siguió espectrofotométricamente, por aumento de la densidad óptica a 340 nm, por formación de NADPH.

### 3.13.6.- CITRATO SINTASA (E.C. 4.1.3.7)

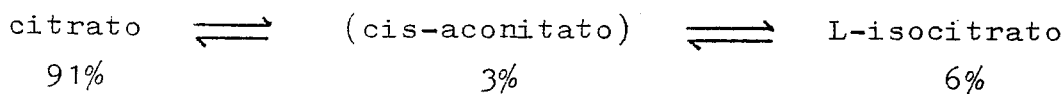
Se determinó por la técnica de SRERE (1969). La mezcla de la reacción contiene:

100 mM de Tris-ClH, pH 8,1; 0,1 mM de 5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzoato); 0,3 mM de acetil-coenzima A; 0,5 mM de oxal-acetato y, aproximadamente, 0,03 mg de proteína del extracto. La cinética frente a acetil-coenzima A fue estudiada por variación de su concentración entre 0,001 mM y 0,3 mM, y frente a oxal-acetato, entre 0,001 mM y 0,5 mM.

La reacción se inició, en todos los casos, por adición de oxal-acetato y fue seguida espectrofotométricamente a 412 nm, por incremento de la densidad óptica debida al ión mercaptano. El coeficiente de extinción molar del ión mercaptano, a 412 nm, es de  $13,6 \times 10^6 \text{ cm}^2/\text{mol}$ .

3.13.7.- ISOCITRATO DESHIDROGENASA NADP (E.C. 1.1.1.42) Y NAD (E.C. 1.1.1.41) DEPENDIENTES.

Se determinaron por una modificación de la técnica de SIEBERT (1963) en la que utilizamos hidrazina, para atrapar el cetoácido producto de la reacción (alfa-cetoglu-tárico), y citrato, para que haya un aporte continuo de L-isocitrato, especialmente a bajas concentraciones. Se usa como sustrato una mezcla de L-isocitrato y citrato en una proporción de 15:1, basándonos en el equilibrio siguiente (KREBS, 1953):



y utilizando la aconitasa del propio extracto ensayado. La mezcla de la reacción contiene:

Tris(25 mM)-hidrazina(125 mM)-ClH, pH 7,4; 1,33 mM de  $\text{SO}_4\text{Mn}$ ; 0,3 mM de EDTA; 0,08 mM de NADP (0,8 mM de NAD en el caso de isocitrato deshidrogenasa NAD-dependiente); aproximadamente 0,05 mg de proteína y sustrato (citrato 15x y DL-isocitrato 2x) en concentraciones que van de 0,001 mM a 2 mM de L-isocitrato.

La reacción se inició por adición del sustrato, tras conveniente equilibración, y se siguió espectrofotométricamente por incremento de la absorbancia a 340 nm, por formación de NADPH (NADH). El coeficiente de extinción molar de NADPH y NADH, a 340 nm, es de  $6,22 \times 10^6 \text{ cm}^2/\text{mol}$ .

### 3.13.8.- SUCCINATO DESHIDROGENASA (E.C. 1.3.99.1)

Se determinó por la técnica de BONNER (1955) en la que se mide la reducción del ferricianuro espectrofotométricamente a 400 nm. Nosotros la hemos adaptado a 420 nm, como la utilizan otros autores, obteniendo mejor resolución. El coeficiente de extinción molar del ferricianuro a 420 nm es de  $1,00 \times 10^6 \text{ cm}^2/\text{mol}$ . Cada mol de succinato transformado conduce a la reducción de 2 moles de ferricianuro. La mezcla de la reacción contiene:

100 mM de tampón fosfato, pH 7,2; 10 mM de cianuro sódico; 1 mM de ferricianuro potásico; aproximadamente 0,1 mg de proteína y succinato sódico en concentraciones de 0,05 mM a 10 mM.

### 3.13.9.- CALCULO DE LA ACTIVIDAD ESPECIFICA

La actividad específica de los enzimas estudiados se calcula en base a la siguiente ecuación:

$$Ae = \frac{DO/\text{min} \times Vf \times 1000}{CE \times Vp \times Cp \times N} \quad \text{nmoles/min/mg proteína}$$

siendo:

Ae = Actividad específica

DO/min = Variación de densidad óptica por minuto

Vf = Volumen final en cubeta, en ml

1000 = Factor de conversión de umoles a nmoles

CE = Coeficiente de extinción molar

Vp = Volumen de extracto proteico en ml

Cp = Concentración proteica del extracto en mg/ml

N = Número de moles de cosustrato que se transforman por mol de sustrato utilizado



### 3.13.10.- CALCULO DE LA CONSTANTE DE MICHAELIS Y DE LA VELOCIDAD MAXIMA

Para el análisis de los resultados obtenidos experimentalmente sobre la cinética enzimática, se procede a representar gráficamente  $V/S$  (abcisas) frente  $V$  (ordenadas) y a calcular la recta de regresión, por el método de los mínimos cuadrados, determinándose así la ecuación, denominada de Eadie-Hofstee,

$$V = -(K_m \times V/S) + V_{max}$$

donde

$V$  = Velocidad de la reacción

$S$  = Concentración de sustrato

$K_m$  = Constante de Michaelis

$V_{max}$  = Velocidad máxima de la reacción

### 3.14.- OBSERVACIONES GENERALES

Todos los medios y soluciones empleados son preparados con agua bidestilada, ya que deben estar completamente exentos de trazas de metales pesados, tóxicos para los cultivos "in vitro", tanto de las células como de los parásitos.

Una vez disueltos los componentes del medio, proceso que se realiza con ayuda de un agitador magnético, se procede a su esterilización.

Para ello, excepto en el caso del medio NNN, preparado como se detalla en el apartado 3.1.1.1., debemos recurrir a una esterilización por filtración, que se realiza a través de equipos de filtración, de plástico adecuado, Sartorius (SM 16510) provistos de filtros Sartorius de 0,45 micras de diámetro de poro, previamente esterilizados al autoclave (Selecta) a 120°C durante 30 minutos, y bajo presión positiva de 1,2Kg/cm<sup>2</sup>, presión suministrada por una bomba Millipore (XX6022-050).

Una vez esterilizados los medios, se llevan los aparatos de filtración al interior de una cámara de

flujo laminar vertical (Glatt) y tras abrirlos, se trasvasa el filtrado, con ayuda de pipetas pasteur estériles al interior de matraces o frascos de tapón de rosca, esterilizados previamente al autoclave a 120°C durante 30 minutos. Los frascos conteniendo el medio estéril se almacenan a 4°C hasta el momento de su uso.

Se siembran muestras de los medios en placas de agar-sangre, incubándose a 37°C durante 72 horas, para comprobar su esterilidad.

Los aparatos de filtración, así como los frascos y pipetas y, en general, todo el material empleado son lavados en detergente Liquinox (Alconox Inc.) especial para cultivos de tejidos, y enjuagados minuciosamente con agua destilada y esterilizados al autoclave a 120°C 30 minutos.

Los frascos empleados, tanto en el cultivo del parásito como en el de las células Vero, son de dos tipos: de vidrio borosilicado de alta pureza, con ausencia absoluta de iones pesados, o de plástico, especialmente diseñados y esterilizados por radiación gamma en fábrica.

Todas las manipulaciones expuestas en el apartado de material y métodos, en lo que a cultivos y expe-

riencias con parásitos y/o células vivas se refiere, se realizan en las más estrictas condiciones de esterilidad, ya que cualquier contaminación destruiría los cultivos y falsearía los resultados.

4.- RESULTADOS

#### 4.1.- CRECIMIENTO Y TRANSFORMACION DE Trypanosoma cruzi EN MEDIOS DE CULTIVO GRACE MODIFICADOS

La metodología utilizada, así como los medios empleados, se describen en el apartado 3.2.4.

Los resultados de los valores máximos de crecimiento y de transformación han sido sometidos a tratamiento estadístico, como se indica en el apartado 3.2.4.1.

##### GRUPO A:

Tratamos de determinar si en el proceso de preparación del medio Grace de OSUNA y col. (1979), los cambios de pH a que es sometido debían seguir el mismo orden ensayado por los autores (acidificación y posterior neutralización) y si el tiempo de acción del pH ácido o básico sobre el medio ejerce alguna influencia en el crecimiento y diferenciación de Trypanosoma cruzi.

Los resultados están expuestos en los cuadros nº 1 y 2 y en las gráficas nº 1 y 2.

Las curvas de crecimiento son similares, pero con un ligero retraso en P3, ocurriendo lo mismo en las

curvas de diferenciación, aunque en P2 parece existir un ligero adelanto.

El análisis estadístico no mostró diferencias significativas entre los valores máximos de ninguno de los medios, habiéndose realizado todas las comparaciones posibles.

=====

Cuadro nº 1.- CRECIMIENTO DE Trypanosoma cruzi EN MEDIOS DE CULTIVO GRACE MODIFICADOS.

GRUPO A.

Días de cultivo	Medios <sup>a</sup>				
	P1 (4) <sup>b</sup>	P2 (3)	P3 (3)	P4 (3)	P5 (3)
Inóculo	1,10	1,10	1,10	1,10	1,10
3	4,29±0,35	4,76±0,85	2,82±0,79	3,86±0,73	3,76±0,32
6	13,52±2,05	13,39±2,36	9,84±0,69	11,68±2,31	11,97±1,46
8	17,04±1,94	18,64±1,46	14,29±0,91	15,68±1,93	16,64±1,03
10	20,42±3,67	21,67±1,87	19,07±2,32	19,13±2,97	19,01±1,69
12	17,00±2,64	16,68±1,64	17,71±1,77	22,37±2,40	15,18±0,80
CM <sup>c</sup>	21,52±3,37	21,67±1,87	19,20±2,24	22,37±2,40	19,01±1,69

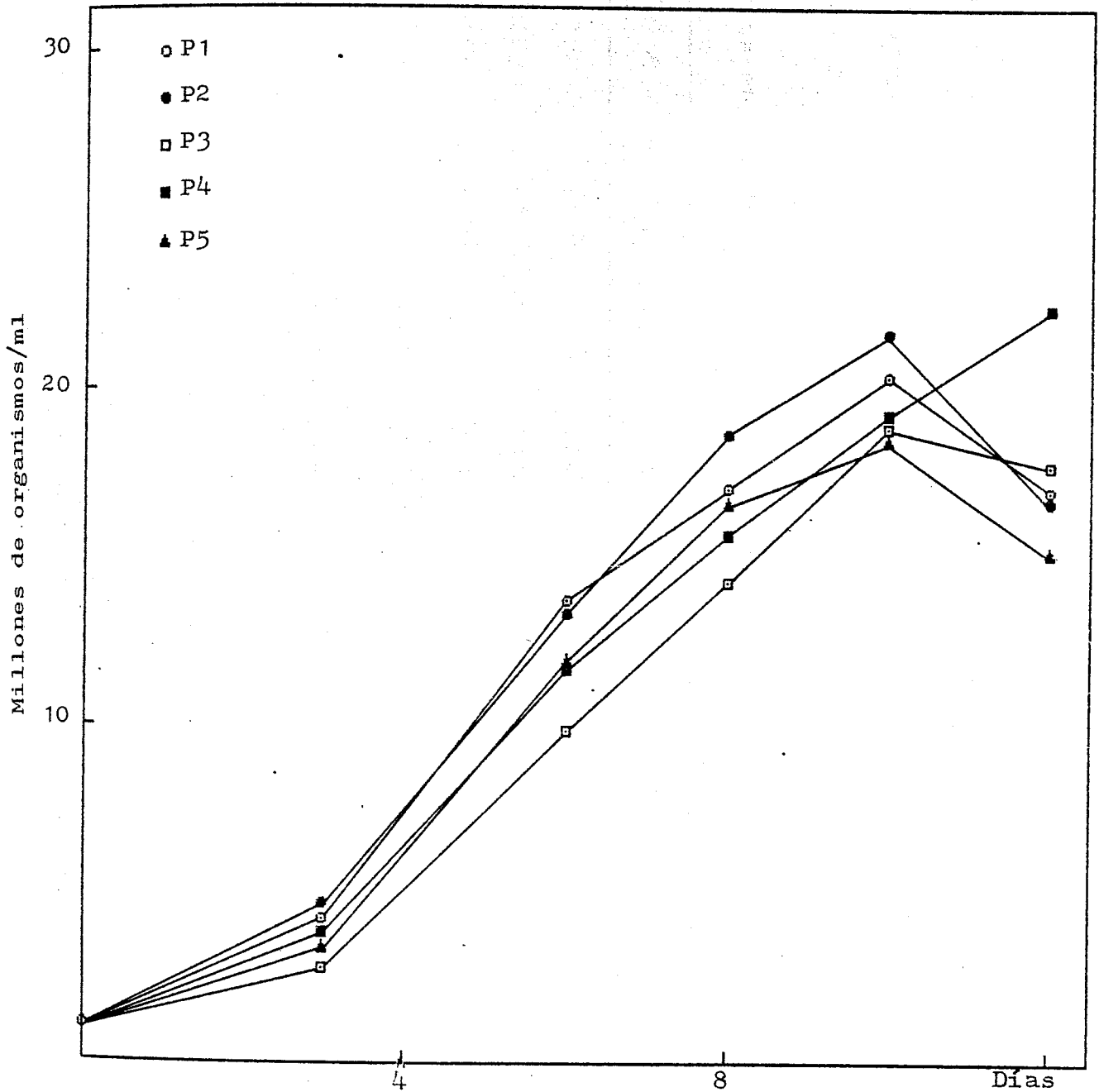
a) Los resultados son media±S.E.M. (error estándar de la media) expresados en millones de organismos/ml.

b) El número entre paréntesis indica el número de experiencias realizadas.

c) Crecimiento máximo= Media del nº de organismos/ml máximo de cada experiencia.

=====





GRAFICA N° 1.- Crecimiento de T. cruzi en medios de cultivo Gra-  
ce. Grupo A.

=====  
 Cuadro nº 2.- PORCENTAJE DE METACICLOGENESIS DE Trypanosoma cruzi EN MEDIOS DE CULTIVO  
 GRACE MODIFICADOS, GRUPO A.

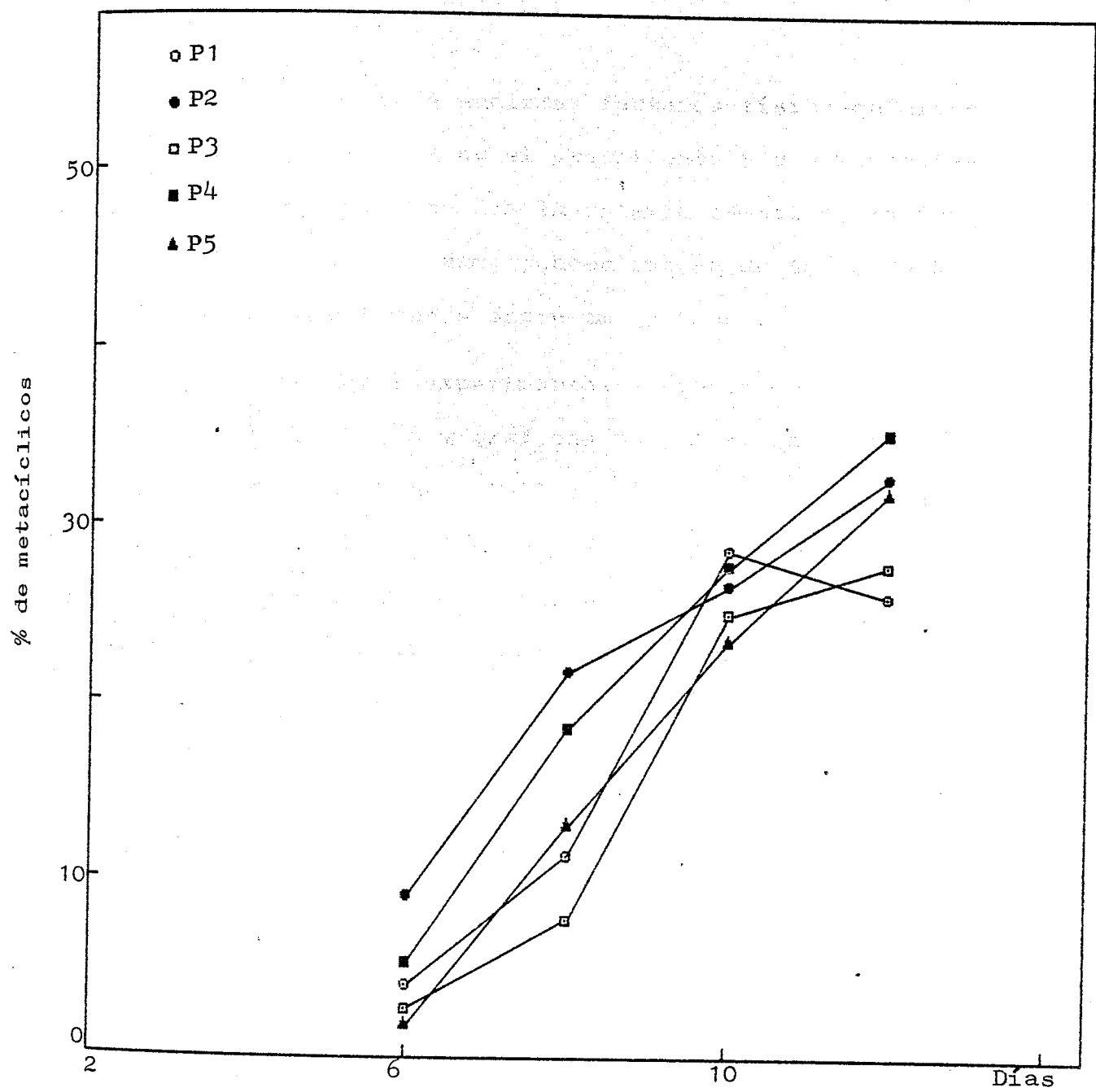
Días de cultivo	Medios <sup>a</sup>				
	P1 (4) <sup>b</sup>	P2 (3)	P3 (3)	P4 (3)	P5 (3)
Inóculo	-	-	-	-	-
6	4,1±1,2	9,1±1,4	2,5±0,5	5,4±0,9	2,1±0,3
8	11,4±2,3	21,7±4,9	7,7±0,9	18,5±5,4	13,2±2,3
10	28,3±4,1	26,6±1,0	25,0±7,8	28,1±6,6	23,6±6,6
12	26,0±3,2	32,8±4,9	27,8±6,1	35,2±6,1	32,3±4,2
MM <sup>c</sup>	30,4±2,9	32,8±4,9	30,5±7,3	35,2±6,1	36,2±1,6

a) Los resultados son media ± S.E.M. (error estándar de la media) expresados en porcentaje de formas metacíclicas.

b) El número de experiencias se indica entre paréntesis.

c) Metaciclogénesis máxima = Media de los porcentajes máximos de formas metacíclicas de cada experiencia.

=====



GRAFICA Nº 2.- Porcentaje de metaciclogénesis de T.cruzi en medios de cultivo Grace modificados. Grupo A.

GRUPO B:

Se pretende analizar factores físico-químicos que pueden intervenir en el crecimiento y/o diferenciación de T. cruzi, como son la presión osmótica, la fuerza iónica, la viscosidad, concentración de  $\text{Na}^+$  o de  $\text{K}^+$  o la relación existente entre ambos iones.

Los datos experimentales vienen detallados en los cuadros nº 3 a 8 y gráficas nº 3 a 8, en donde se observa un crecimiento similar en todos los casos, excepto en G7 y G8, en los que el crecimiento es menor, pero al comparar estadísticamente los valores máximos de los medios frente al control (G0), en ningún caso se encontraron diferencias significativas.

En cuanto a los valores de transformación, se observa una curva similar en todos los medios, excepto en G1, la cual se adelanta, y en G9, que se atrasa. El análisis estadístico indica que los valores máximos de diferenciación son similares al control, excepto en G1 ( $P < 0,03$ ) y G2 ( $P < 0,004$ ), que son superiores.

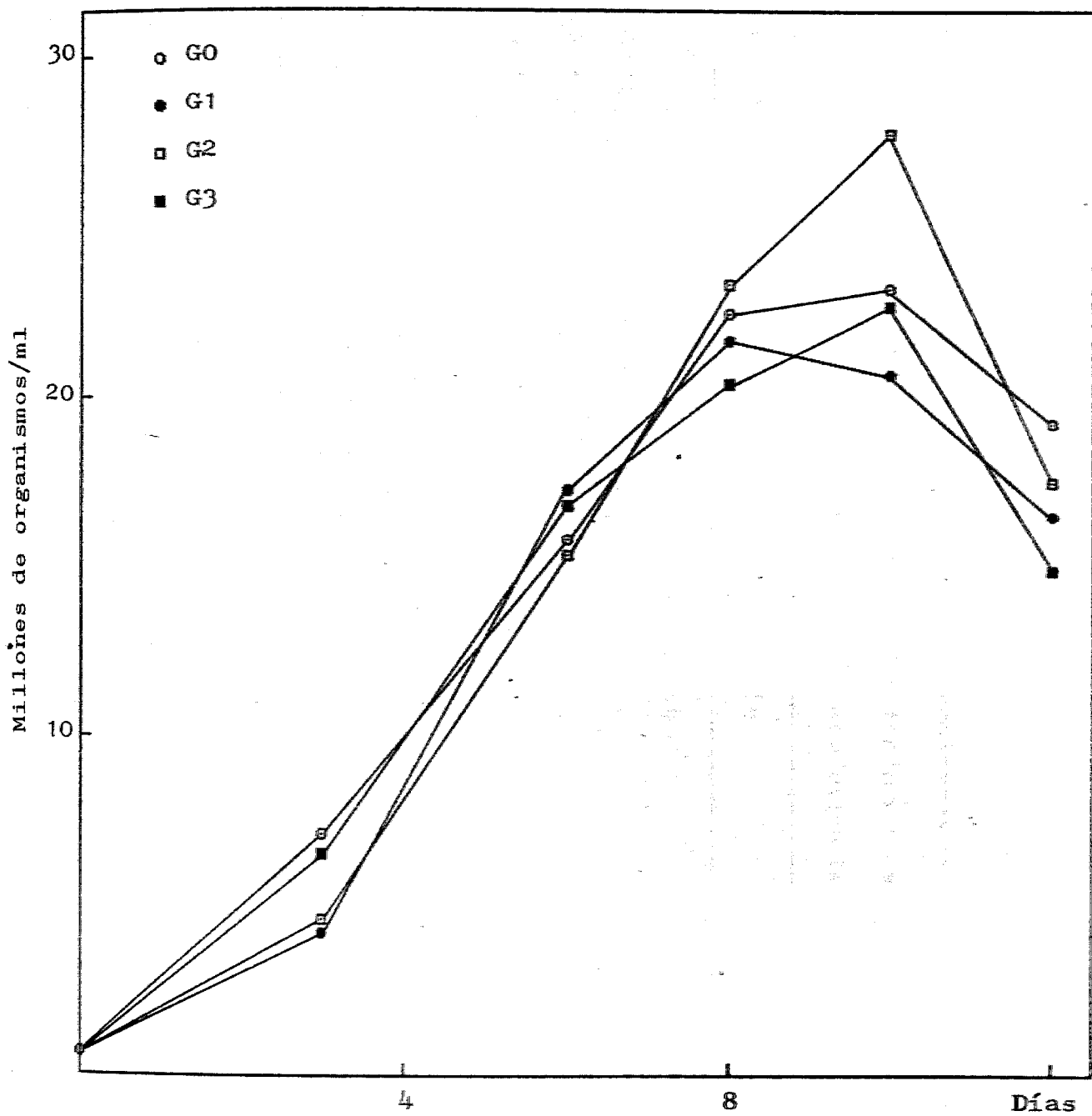
=====  
 Cuadro nº 3.- CRECIMIENTO DE Trypanosoma cruzi EN MEDIOS DE CULTIVO GRACE MODIFICADOS.

GRUPO B.

Días de cultivo	Medios <sup>a</sup>			
	<u>G0 (11)<sup>b</sup></u>	<u>G1 (5)</u>	<u>G2 (3)</u>	<u>G3 (3)</u>
Inóculo	0,70	0,70	0,70	0,70
3	7,14±1,96	4,22±0,67	4,43±1,44	6,51±1,00
6	15,80±1,81	17,10±1,45	15,36±1,64	17,01±2,24
8	22,47±2,38	21,70±2,64	23,31±4,77	20,37±2,03
10	23,07±2,43	20,67±2,98	27,76±4,24	22,93±5,52
12	19,23±1,86	16,48±3,86	17,49±4,96	14,90±3,28
CM <sup>c</sup>	26,34±2,43	23,62±2,12	27,76±4,24	24,48±4,02

Las notas a, b y c, se corresponden con las del cuadro nº1.

=====



GRAFICA N° 3.- Crecimiento de T.cruzi en medios de cultivo Gra-  
ce modificados. Grupo B.

=====

Cuadro n° 4.- PORCENTAJE DE METACICLOGÉNESIS DE Trypanosoma cruzi EN MEDIOS DE CULTIVO GRACE MODIFICADOS. GRUPO B.

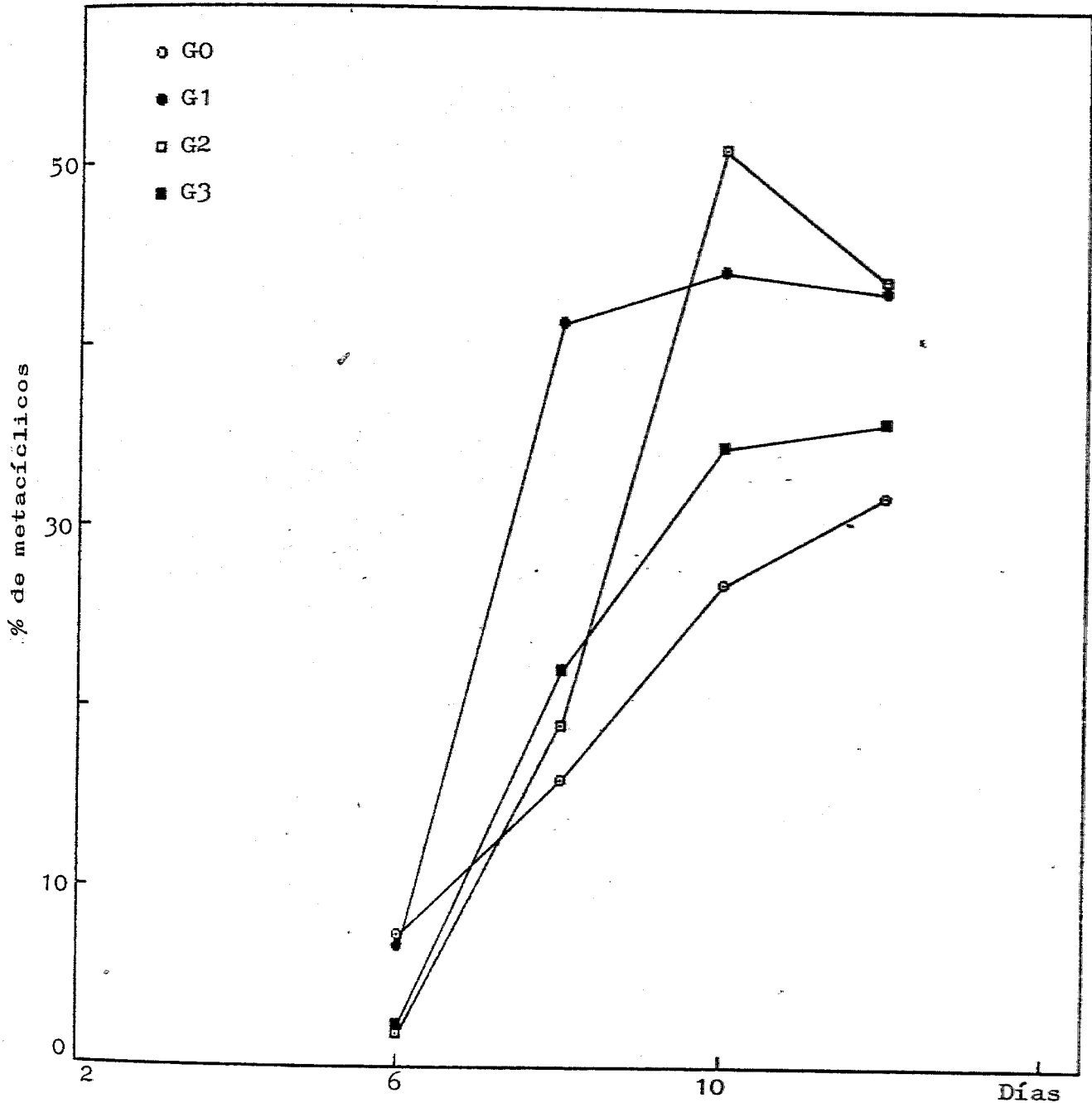
=====

Días de cultivo	Medios <sup>a</sup>			
	G0 (11) <sup>b</sup>	G1 (5)	G2 (3)	G3 (3)
Inóculo	-	-	-	-
6	7,4±3,2	6,7±1,0	2,0±0,8	2,3±0,2
8	16,0±4,4	41,4±4,1	19,0±1,5	22,1±5,3
10	26,9±3,5	44,2±4,4	51,0±2,3	34,5±2,6
12	31,7±2,4	43,1±4,1	43,7±7,0	35,9±7,2
MM <sup>c</sup>	36,8±2,2	47,3±4,3 <sup>*</sup>	52,8±1,8 <sup>***</sup>	38,2±6,1

Las notas a, b y c, se corresponden con las del cuadro n° 2.

Significación estadística: (\*) P < 0,05; (\*\*\*) P < 0,005.

=====



GRAFICA N° 4.- Porcentaje de metacicloogénesis de *T.cruzi* en medios de cultivo Grace modificados. Grupo B.



=====

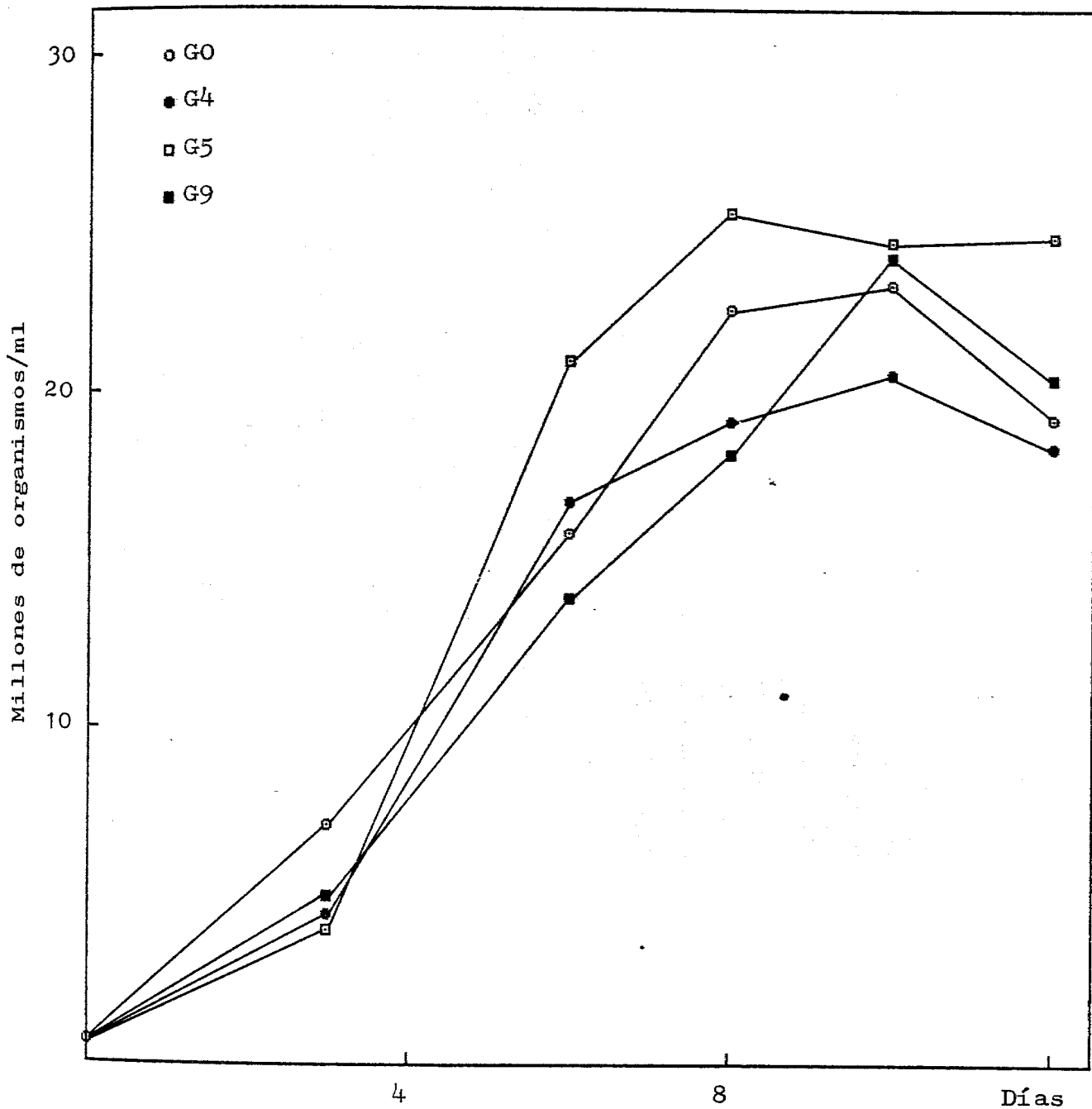
Cuadro nº 5.- CRECIMIENTO DE Trypanosoma cruzi EN MEDIOS DE CULTIVO GRACE MODIFICADOS

GRUPO B.

Días de <u>cultivo</u>	Medios <sup>a</sup>		
	<u>G4 (5)<sup>b</sup></u>	<u>G5 (4)</u>	<u>G9 (4)</u>
Inóculo	0,70	0,70	0,70
3	4,65±0,81	4,63±0,55	4,94±0,93
6	16,72±2,95	20,96±2,13	13,88±1,95
8	19,14±2,39	25,32±1,75	18,12±1,72
10	20,53±2,87	24,26±2,25	24,22±3,48
12	18,31±1,38	24,62±4,87	20,37±3,54
CM <sup>o</sup>	23,17±2,68	29,26±3,04	24,54±3,18

Las notas a, b y c, se corresponden con las del cuadro nº 1.

=====



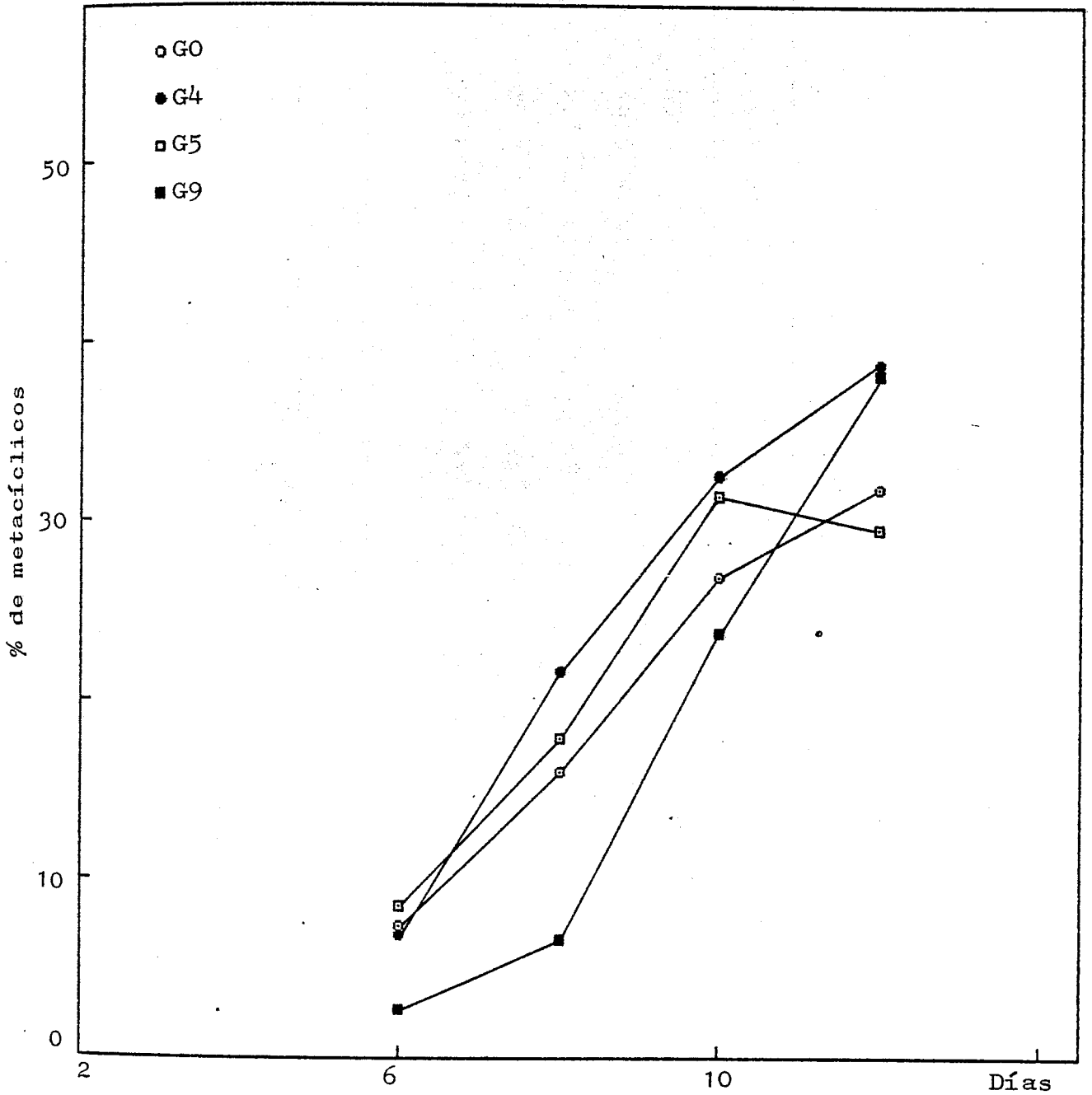
GRAFICA Nº 5.- Crecimiento de *T. cruzi* en medios de cultivo Gracie modificados. Grupo B.

=====  
 Cuadro nº 6.- PORCENTAJE DE METACICLOGENESIS DE Trypanosoma cruzi EN MEDIOS DE CULTI-  
 VO GRACE MODIFICADOS. GRUPO B.  
 =====

Días de cultivo	Medios <sup>a</sup>		
	G4 (5) <sup>b</sup>	G5 (4)	G9 (4)
Inóculo	-	-	-
6	6,9±2,9	8,5±6,8	2,7±1,0
8	21,6±8,5	17,9±8,8	6,6±2,0
10	32,5±7,5	31,4±8,0	23,8±6,7
12	38,8±6,3	29,5±5,3	38,1±7,5
MM <sup>c</sup>	42,1±6,5	37,8±5,3	38,1±7,5

Las notas a, b y c, se corresponden con las del cuadro nº 2.

=====



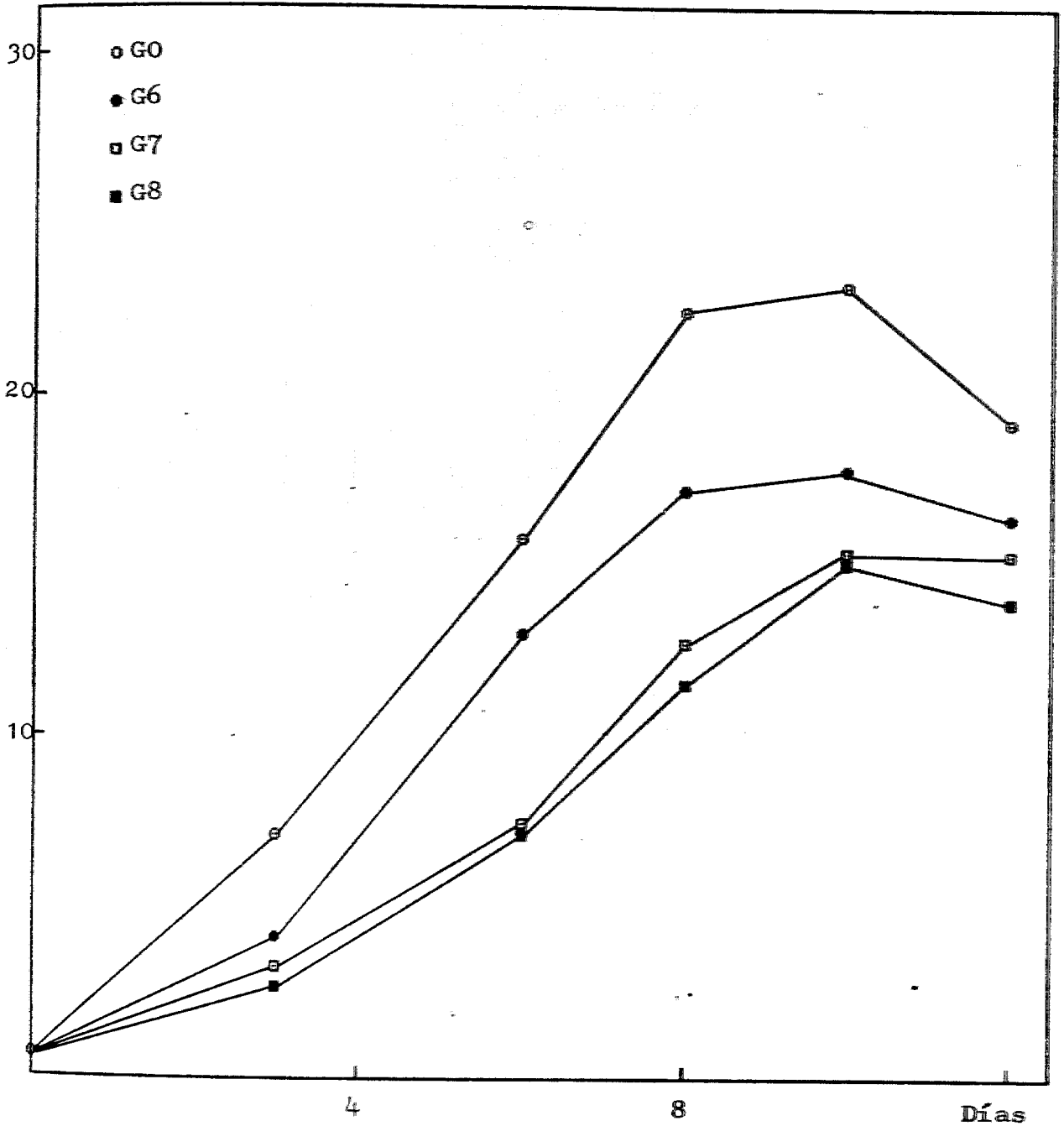
GRAFICA Nº 6.- Porcentaje de metacicloogénesis de *T. cruzi* en medios de cultivo Grace modificados. Grupo B.

=====  
 Cuadro nº 7.- CRECIMIENTO DE Trypanosoma cruzi EN MEDIOS DE CULTIVO GRACE MODIFICADOS  
 GRUPO B.  
 =====

Días de <u>cultivo</u>	Medios <sup>a</sup>		
	<u>G6 (8)<sup>b</sup></u>	<u>G7 (3)</u>	<u>G8 (2)</u>
Inóculo	0,70	0,70	0,70
3	4,15±0,41	3,25±1,54	2,66±1,66
6	12,99±1,96	7,49±3,12	7,12±2,32
8	17,23±1,66	12,74±3,44	11,52±1,12
10	17,79±2,01	15,39±2,50	15,04±0,64
12	16,38±2,42	15,31±0,46	13,92±3,68
CM <sup>c</sup>	20,01±1,88	16,64±1,64	16,00±1,60

Las notas a, b y c, se corresponden con las del cuadro nº 1.

=====



GRAFICA Nº 7.- Crecimiento de T.cruzi en medios de cultivo Gra-  
ce modificados. Grupo B.

=====

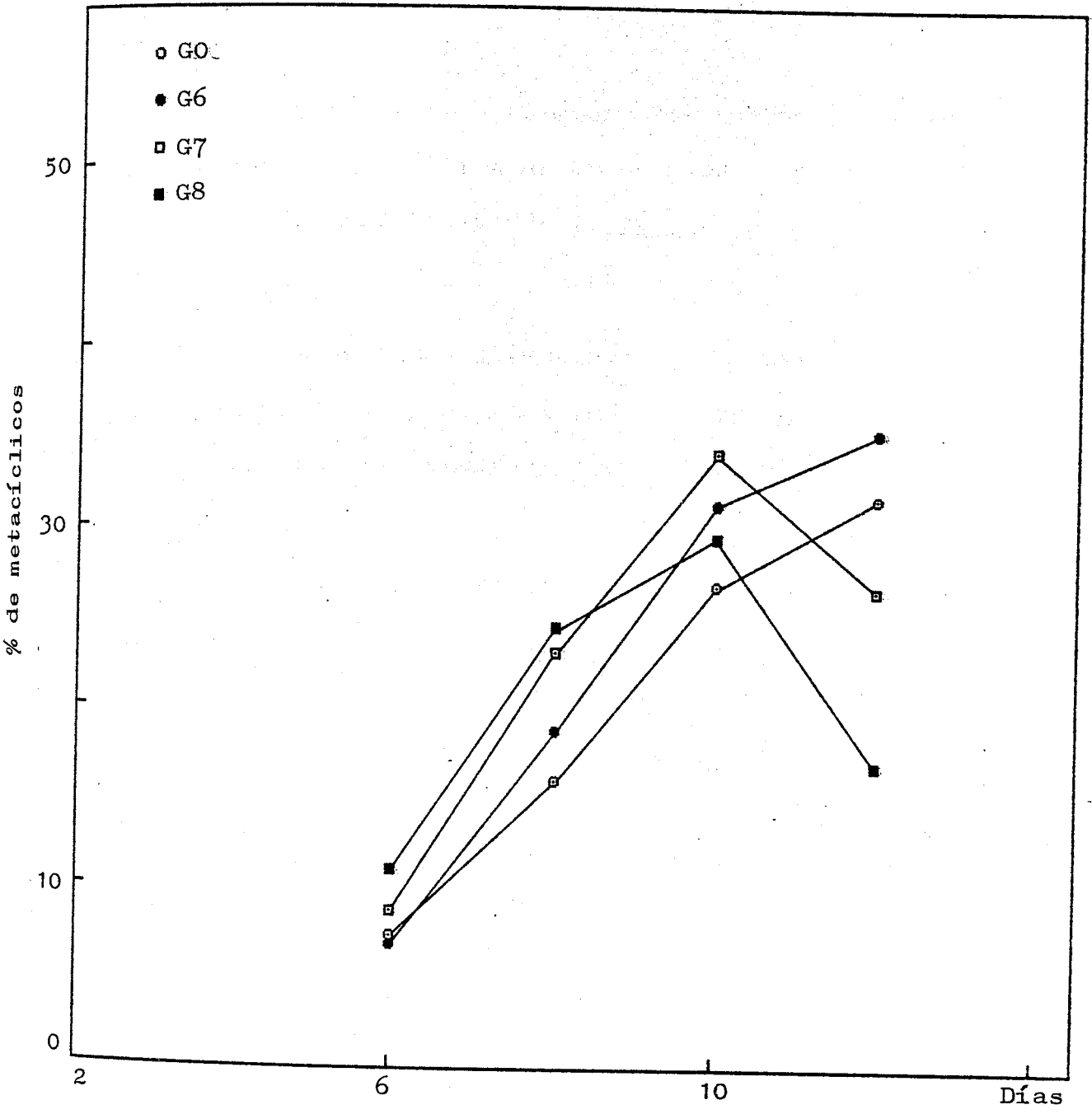
Cuadro nº 8.- PORCENTAJE DE METACICLOGENESIS DE Trypanosoma cruzi EN MEDIOS DE CULTIVO GRACE MODIFICADOS. GRUPO B.

=====

Días de cultivo	Medios <sup>a</sup>		
	G6 (8) <sup>b</sup>	G7 (3)	G8 (2)
Inóculo	-	-	-
6	6,9±3,7	8,7±0,9	11,0±1,0
8	18,8±4,7	23,1±1,2	24,5±0,5
10	31,4±3,7	34,3±1,2	29,5±1,5
12	35,4±3,4	26,6±1,0	16,9±1,9
MM <sup>c</sup>	38,9±3,4	34,3±1,2	29,5±1,5

Las notas a, b y c, se corresponden con las del cuadro nº 2.

=====



GRAFICA Nº 8.- Porcentaje de metaciclogénesis de T.cruzi en medios de cultivo Grace modificados. Grupo B.



GRUPO C:

Se trata de determinar las posibles sustancias que pueden estar implicadas en un buen crecimiento y/o una buena diferenciación de T. cruzi.

a) Subgrupo vitaminas

Se pretende determinar si la ausencia de alguna o algunas vitaminas influyen de forma positiva o negativa sobre el crecimiento y/o la diferenciación de Trypanosoma cruzi.

Los valores experimentales están expuestos en los cuadros nº 9 a 12 y en las gráficas nº 9 a 12. De ellos se deduce una disminución generalizada del crecimiento con respecto al control (GPO), que es significativa, a nivel de crecimiento máximo, en GPT ( $P < 0,04$ ), GPP ( $P < 0,04$ ), GPR ( $P < 0,02$ ) y, sobre todo, en GPF ( $P < 0,007$ ), y aunque no significativa, sí clara en GPN. Por el contrario, GPOv sostuvo un crecimiento acorde con el control, aunque algo más retrasado.

En cuanto a la diferenciación, en todos los casos es claramente inferior al control a partir del 8º día de cultivo, excepto GPP, aunque a nivel de transformación máxima no hay diferencias estadísticamente significativas.

=====

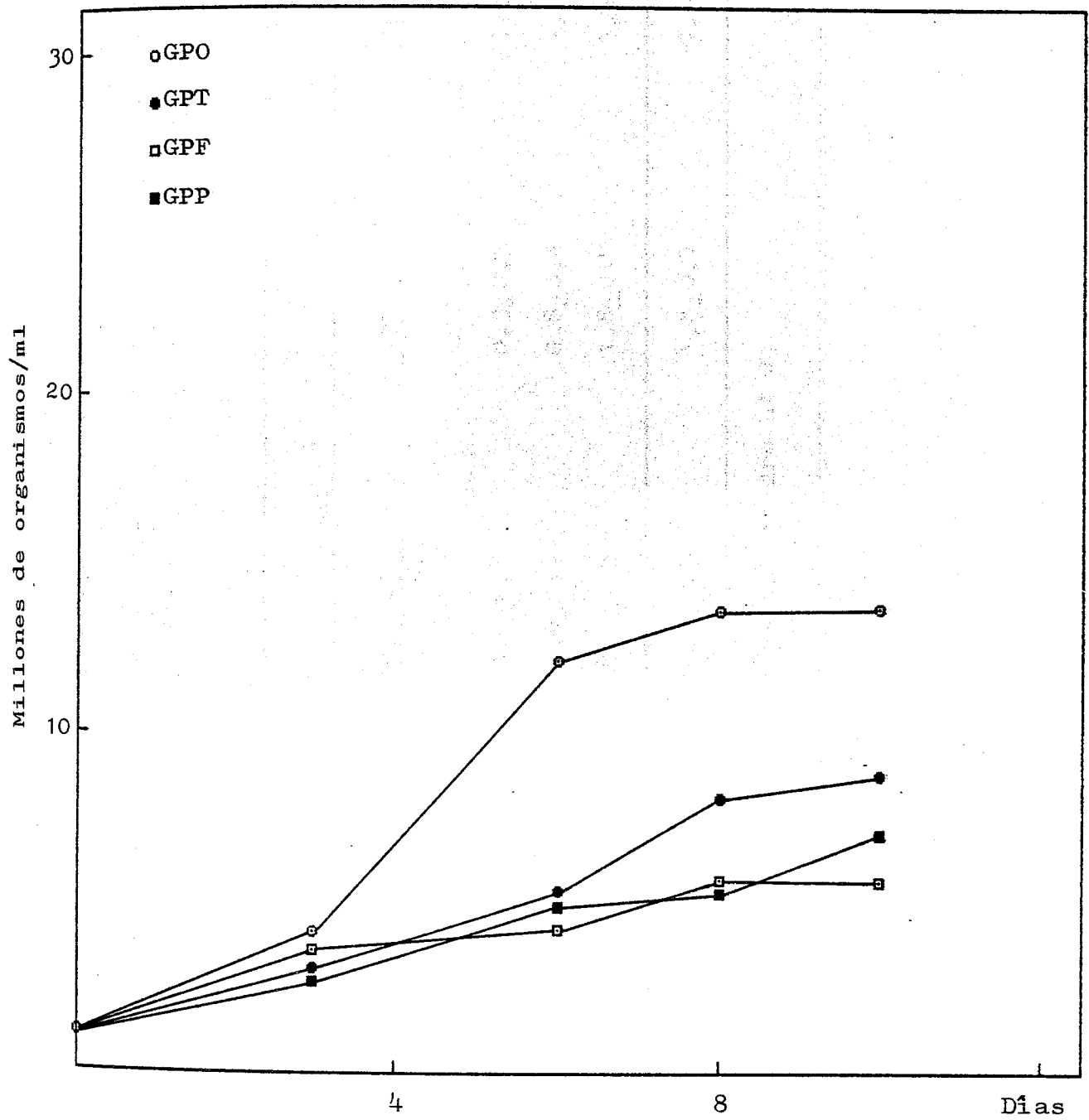
Cuadro nº 9.- CRECIMIENTO DE Trypanosoma cruzi EN MEDIOS DE CULTIVO GRACE MODIFICADOS.  
GRUPO C. SUBGRUPO VITAMINAS.

Días de <u>cultivo</u>	Medios <sup>a</sup>			
	<u>GPO (8)<sup>b</sup></u>	<u>GPT (4)</u>	<u>GPF (3)</u>	<u>GPP (2)</u>
Inóculo	1,11	1,11	1,11	1,11
3	4,12±0,37	3,05±0,61	3,57±0,40	2,68±0,20
6	12,14±1,21	5,31±0,92	4,17±0,58	4,86±0,75
8	13,62±1,15	8,08±0,89	5,60±0,76	5,44±0,24
10	13,69±1,48	8,76±1,08	5,57±0,69	7,00±1,72
CM <sup>c</sup>	14,53±1,41	9,52±0,86 <sup>**</sup>	5,95±0,82 <sup>***</sup>	7,00±1,72 <sup>*</sup>

Las notas a, b y c, se corresponden con las del cuadro nº1.

Significación estadística: (\*) P < 0,05; (\*\*) P < 0,01.

=====



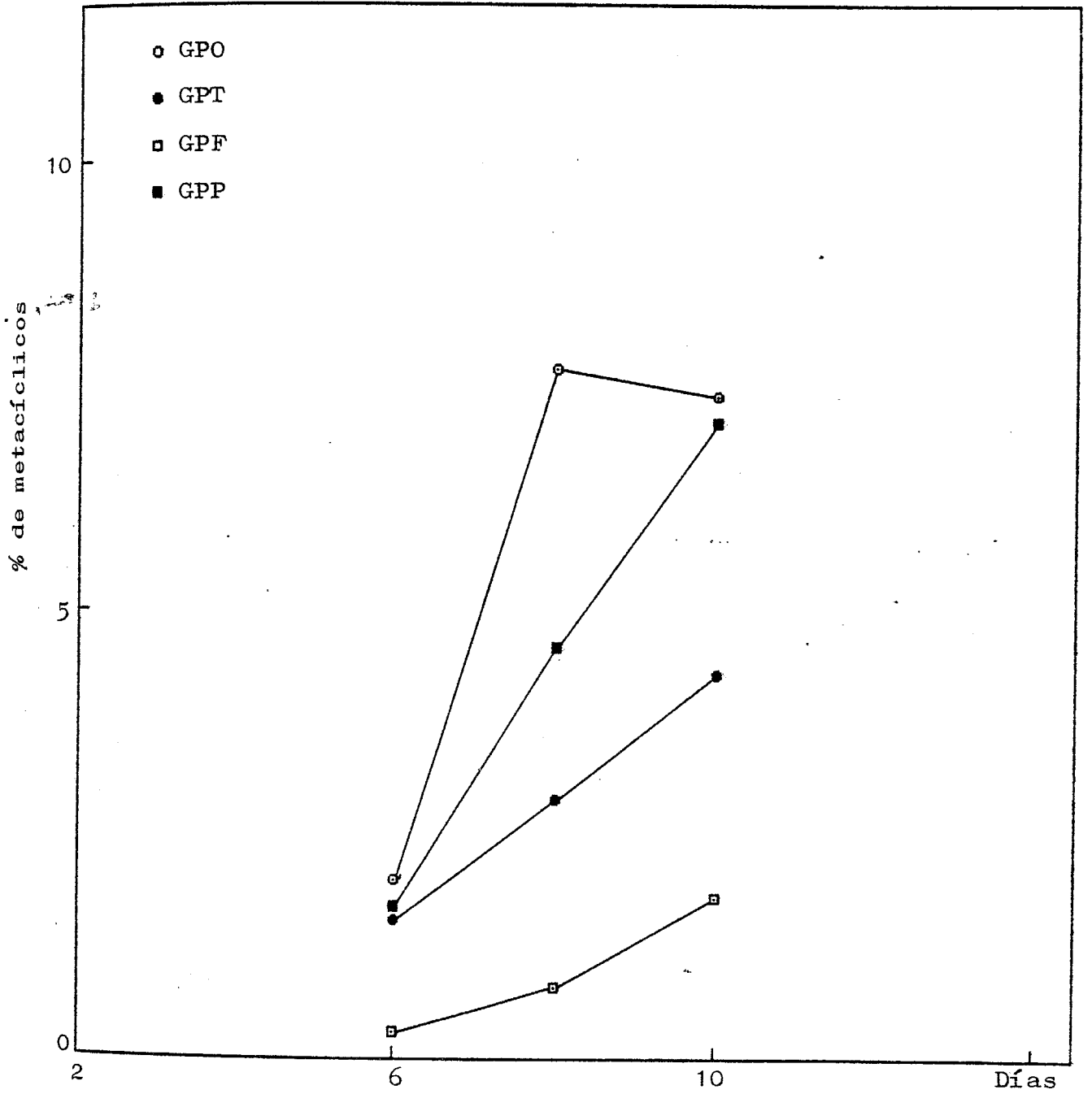
GRAFICA N° 9.- Crecimiento de *T. cruzi* en medios de cultivo Gracce modificados. Grupo C. Subgrupo Vitaminas.

=====  
 Cuadro nº 10.- PORCENTAJE DE METACICLOGENESIS DE Trypanosoma cruzi EN MEDIOS DE CULTIVO  
 GRACE MODIFICADOS. GRUPO C. SUBGRUPO VITAMINAS.  
 =====

Días de <u>cultivo</u>	Medios <sup>a</sup>			
	<u>GPO (8)<sup>b</sup></u>	<u>GPT (4)</u>	<u>GPF (3)</u>	<u>GPP (2)</u>
Inóculo	-	-	-	-
6	2,0±0,3	1,7±0,3	0,3±0,3	1,7±0,2
8	7,7±2,5	2,9±0,9	0,8±0,1	4,6±0,5
10	7,4±1,4	4,3±1,5	1,8±0,7	7,1±3,1
MM <sup>c</sup>	9,8±2,3	4,3±1,5	1,8±0,7	7,6±2,6

Las notas a, b y c, se corresponden con las del cuadro nº 2.

=====



GRAFICA Nº 10.- Porcentaje de metaciclogénesis de T.cruzi en medios de cultivo Grace modificados. Grupo C.Subgrupo Vitaminas.

=====

Cuadro n° 11.- CRECIMIENTO DE Trypanosoma cruzi EN MEDIOS DE CULTIVO GRACE MODIFICADOS

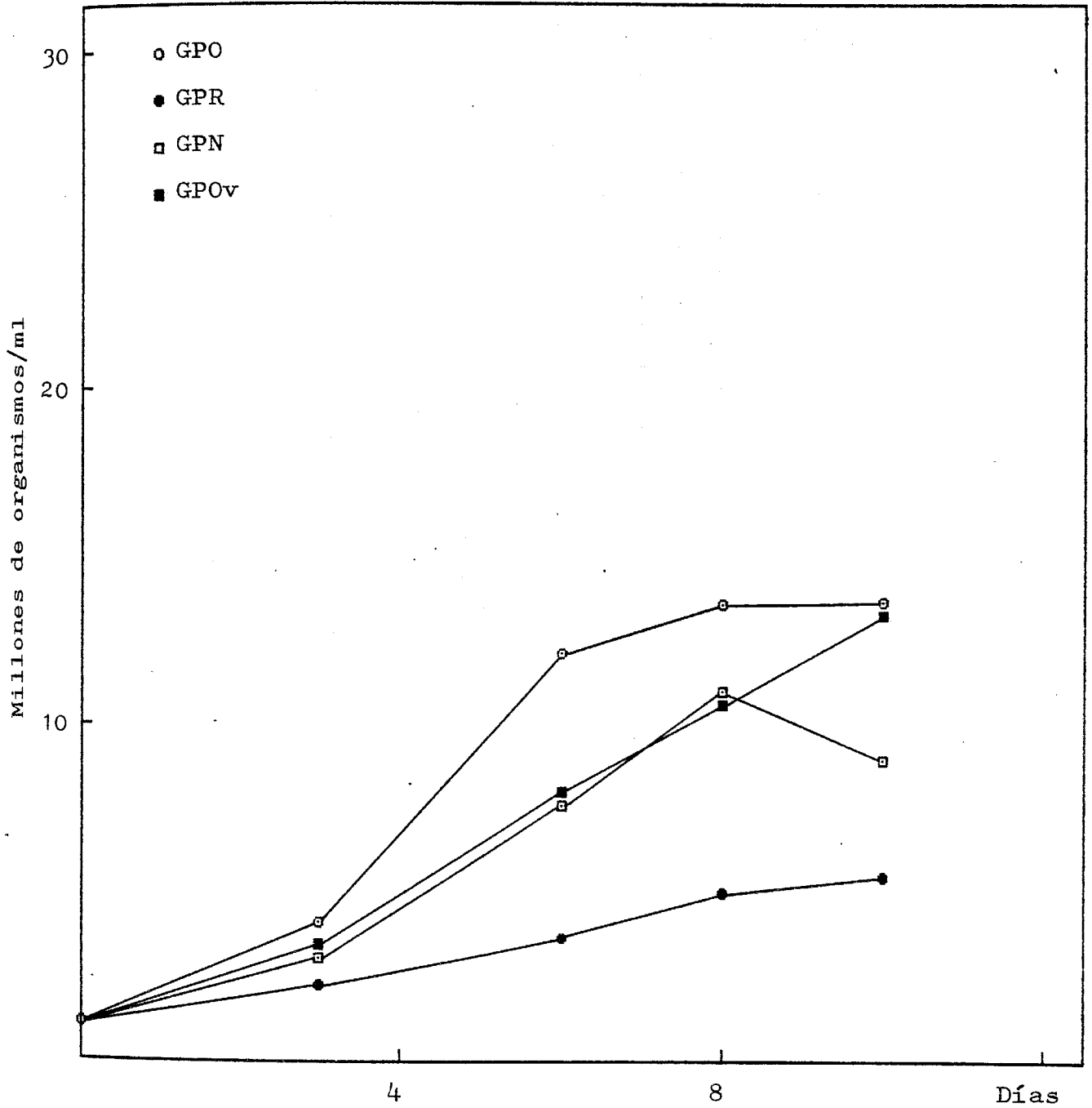
GRUPO C. SUBGRUPO VITAMINAS.

Días de cultivo	Medios <sup>a</sup>		
	GPR (2) <sup>b</sup>	GPN (3)	GPOv (3)
Inóculo	1,11	1,11	1,11
3	2,28±0,20	3,36±1,01	3,36±0,90
6	3,69±0,31	7,62±0,75	7,98±1,15
8	5,00±0,76	10,83±0,36	10,72±0,86
10	5,44±0,56	8,96±0,26	13,53±1,03
CM <sup>c</sup>	5,44±0,56*	10,83±0,36	13,53±1,03

Las notas a, b y c, se corresponden con las del cuadro n° 1.

Significación estadística: (\*) P < 0,05.

=====



GRAFICA N° 11.- Crecimiento de *T. cruzi* en medios de cultivo Gra-  
ce modificados. Grupo C. Subgrupo Vitaminas.

=====

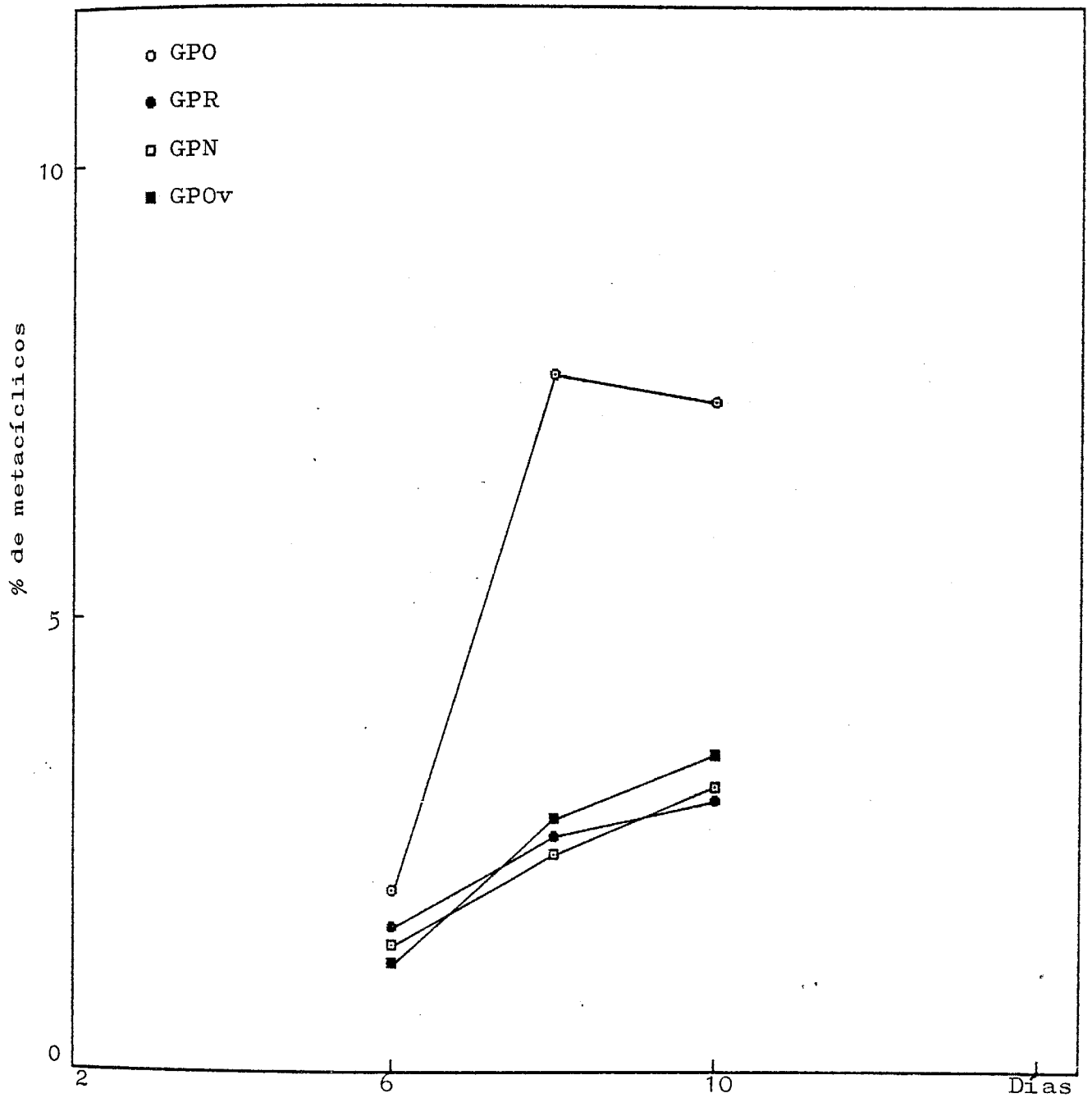
Cuadro nº 12.- PORCENTAJE DE METACICLOGENESIS DE Trypanosoma cruzi EN MEDIOS DE CULTIVO GRACE MODIFICADOS. GRUPO C. SUBGRUPO VITAMINAS.

Días de cultivo	Medios <sup>a</sup>		
	GPR (2) <sup>b</sup>	GPN (3)	GPOv (3)
Inóculo	-	-	-
6	1,6±0,4	1,4±0,3	1,2±0,1
8	2,6±0,2	2,4±0,7	2,8±0,6
10	3,0±0,2	3,0±0,9	3,5±0,5
MM <sup>c</sup>	3,0±0,2	3,0±0,9	3,5±0,5

Las notas a, b y c, se corresponden con las del cuadro nº 2.

=====





GRAFICA Nº 12.- Porcentaje de metacicloogénesis de T.cruzi en medios de cultivo Grace modificados. Grupo C. Subgrupo Vitaminas.

b) Subgrupo aminoácidos

Se pretende determinar con GP6 y GP4 si los aminoácidos más lábiles, a la hidrólisis ácida o básica, son necesarios para el crecimiento y/o la metaciclologénesis o si su ausencia puede afectarles.

Los resultados indican que en ambos medios se retarda el crecimiento. En GP6, a los 10 días de cultivo, la diferencia de crecimiento máximo con el control (GP0) es claramente significativa ( $P < 0,003$ ). Pero a los 35 días de cultivo, el número de tripanosomas/ml era similar al del control al 10º día (el control, al día 35º de cultivo, contaba sólo con  $1 \times 10^6$  organismos/ml, la mayoría en mal estado) (Cuadros nº 13 y 14 y Gráficas nº 13 y 14)

En GP4, durante los primeros 10 días de cultivo hubo un ligero y paulatino descenso del número de flagelados/ml hasta que terminaban prácticamente por desaparecer, para volver a aparecer a los 20-25 días de cultivo, iniciándose un lento crecimiento y observándose un máximo variable entre los 45-60 días de cultivo, con valores similares a los del control al 10º día, aunque la diferenciación fue mínima (1-2%). El control carece prácticamente de organismos vivos al 45-60 días de cultivo.

El medio GPMet se ensayó para comprobar si la metionina podía influir en el crecimiento y transformación de T. cruzi, teniendo en cuenta su actuación en otros microorganismos, comprobándose que la diferenciación es claramente inferior al control, aunque sus valores máximos no tienen diferencias estadísticamente significativas con el mismo, mientras que el crecimiento sólo fue ligeramente inferior al control (cuadros nº 13 y 14 y gráficas nº 13 y 14).

=====

Cuadro nº 13.- CRECIMIENTO DE Trypanosoma cruzi EN MEDIOS DE CULTIVO GRACE MODIFICADOS

GRUPO C. SUBGRUPO AMINOACIDOS.

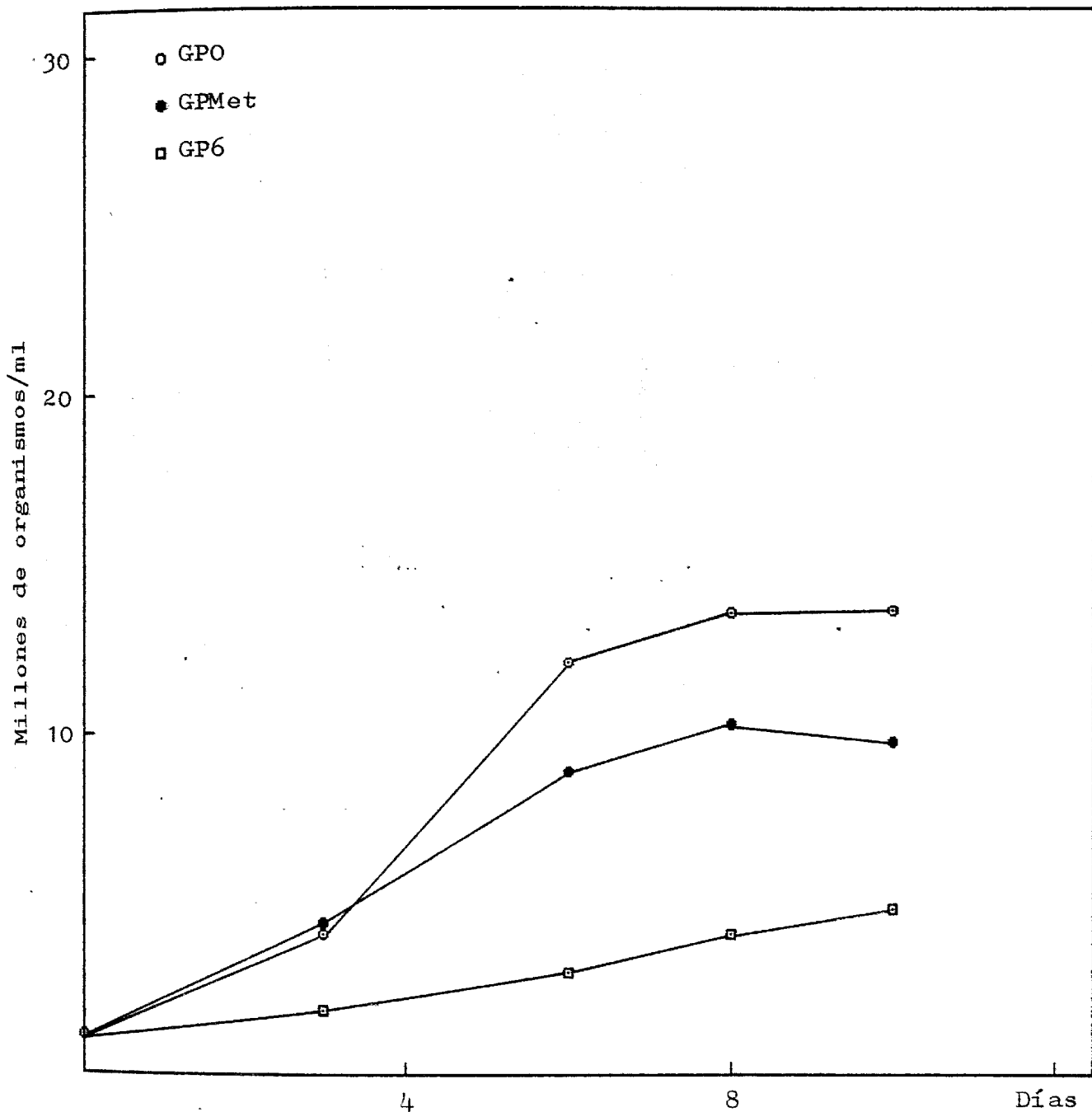
=====

Días de <u>cultivo</u>	Medios <sup>a</sup>		
	<u>GPO (8)<sup>b</sup></u>	<u>GPMet (4)</u>	<u>GP6 (4)</u>
Inóculo	1,11	1,11	1,11
3	4,12 $\pm$ 0,37	4,33 $\pm$ 0,57	1,89 $\pm$ 0,22
6	12,14 $\pm$ 1,21	8,95 $\pm$ 1,18	3,02 $\pm$ 0,50
8	13,62 $\pm$ 1,15	10,32 $\pm$ 0,22	4,11 $\pm$ 0,90
10	13,69 $\pm$ 1,48	9,82 $\pm$ 0,92	4,84 $\pm$ 1,59
CM <sup>c</sup>	14,53 $\pm$ 1,41	10,90 $\pm$ 0,54	5,02 $\pm$ 1,53 <sup>***</sup>

Las notas a, b y c, se corresponden con las del cuadro nº 1.

Significación estadística: (\*\*\*) P < 0,005.

=====



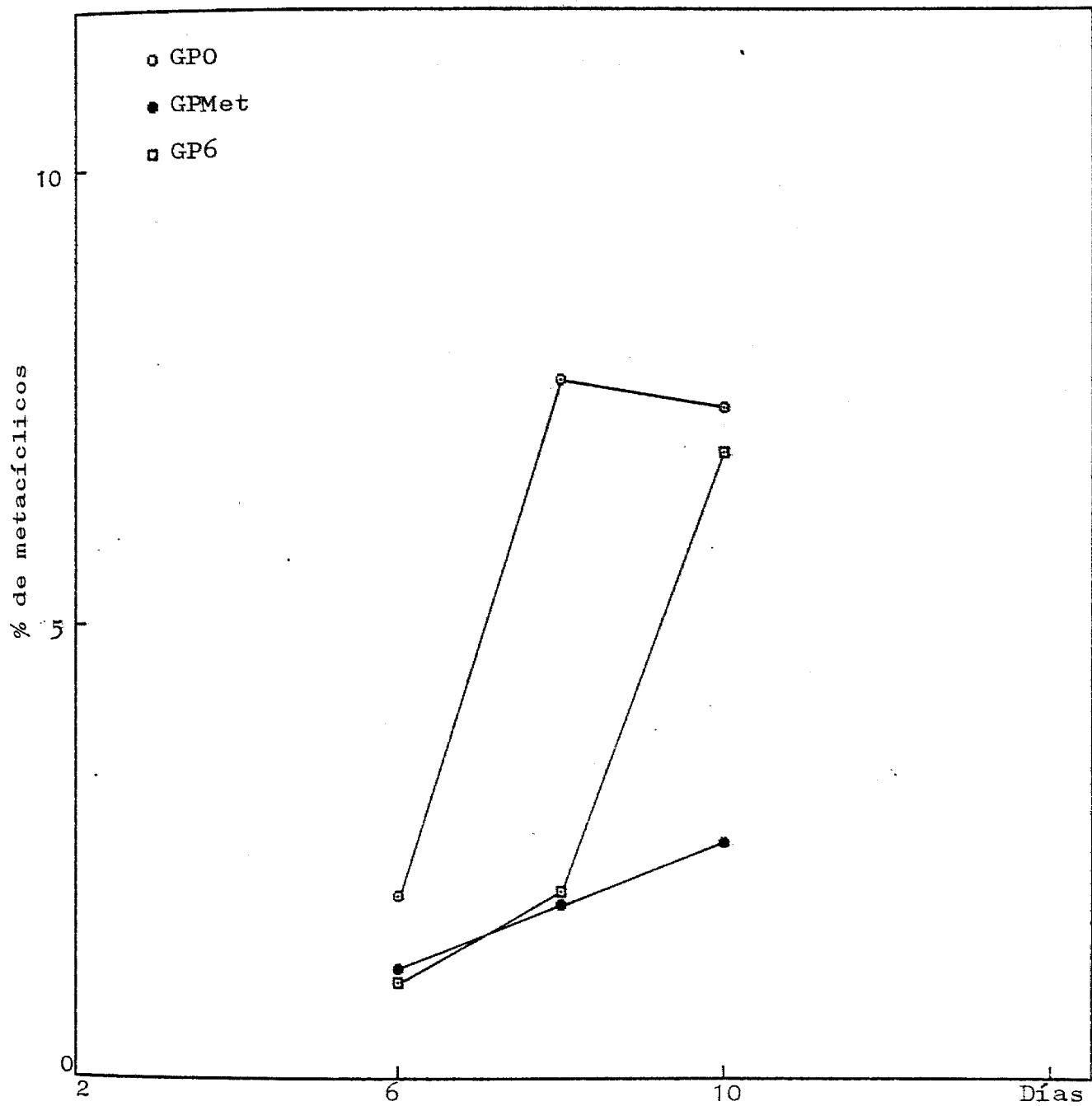
GRAFICA Nº 13.- Crecimiento de T.cruzi en medios de cultivo Gra-  
ce modificados. Grupo C. Subgrupo Aminoácidos.

=====  
 Cuadro nº 14.- PORCENTAJE DE METACICLOGENESIS DE Trypanosoma cruzi EN MEDIOS DE CULTI-  
 VO GRACE MODIFICADOS. GRUPO C. SUBGRUPO AMINOACIDOS.  
 =====

Días de cultivo	Medios <sup>a</sup>		
	<u>GPO (8)<sup>b</sup></u>	<u>GPMet (4)</u>	<u>GP6 (4)</u>
Inóculo	-	-	-
6	2,0±0,3	1,2±0,1	1,1±0,1
8	7,7±2,5	1,9±0,5	2,0±0,9
10	7,4±1,4	2,6±0,8	6,9±1,1
MM <sup>c</sup>	9,8±2,3	2,6±0,8	6,9±1,1

Las notas a, b y c, se corresponden con las del cuadro nº 2.

=====



GRAFICA N° 14.- Porcentaje de metaciclogénesis de T. cruzi en medios de cultivo Grace modificados. Grupo C. Subgrupo Aminoácidos.

c) Subgrupo azúcares y ácidos orgánicos

Por una parte se comprueba si la ausencia o disminución de azúcares en el medio de cultivo, así como la eliminación de los ácidos orgánicos de su composición, afecta el crecimiento y/o diferenciación de Trypanosoma cruzi.

Así, comprobamos que mientras GP1 sólo produce un ligero aumento del crecimiento máximo, acompañado de un decrecimiento similar de transformación máxima, en cambio, GP3 y GP5 sí provocan un aumento significativo del crecimiento máximo ( $P < 0,05$  y  $P < 0,009$ , respectivamente), destacando que GP3 alcanza más rápidamente la fase estacionaria que el resto de los cultivos (cuadros nº 15 y 16 y gráficas nº 15 y 16).

En cuanto a la transformación máxima, en GP3 es ligeramente superior al control (GP0), mientras que en GP5 es muy superior ( $P < 0,0002$ ), (cuadro y gráfica nº 16).

Por otra parte, se ensayan medios sin glucosa, fructosa, ni tiamina (GP2), para ver si ésta o los productos de su hidrólisis (GP2A, GP2B y GP2C) son capaces de inducir la diferenciación sin afectar el crecimiento de T. cruzi.



El crecimiento es claramente superior al control (GP0) a partir del 8º día de cultivo. El crecimiento máximo, sin embargo, sólo es significativo en GP2 ( $P < 0,03$ ) y GP2C ( $P < 0,05$ ), aunque GP2A y GP2B alcanzan un crecimiento máximo similar (cuadro y gráfica nº 17).

Por lo que se refiere a la diferenciación, en todos los casos es significativamente superior al control (GP2,  $P < 0,004$ ; GP2A,  $P < 0,02$ ; GP2B,  $P < 0,003$  y GP2C,  $P < 0,005$ ) (cuadro y gráfica nº 18). Entre estos medios, sólo es ligeramente significativa la diferencia entre GP2A y GP2B ( $P < 0,04$ ).

=====

Cuadro nº 15.- CRECIMIENTO DE Trypanosoma cruzi EN MEDIOS DE CULTIVO GRACE MODIFICADOS.

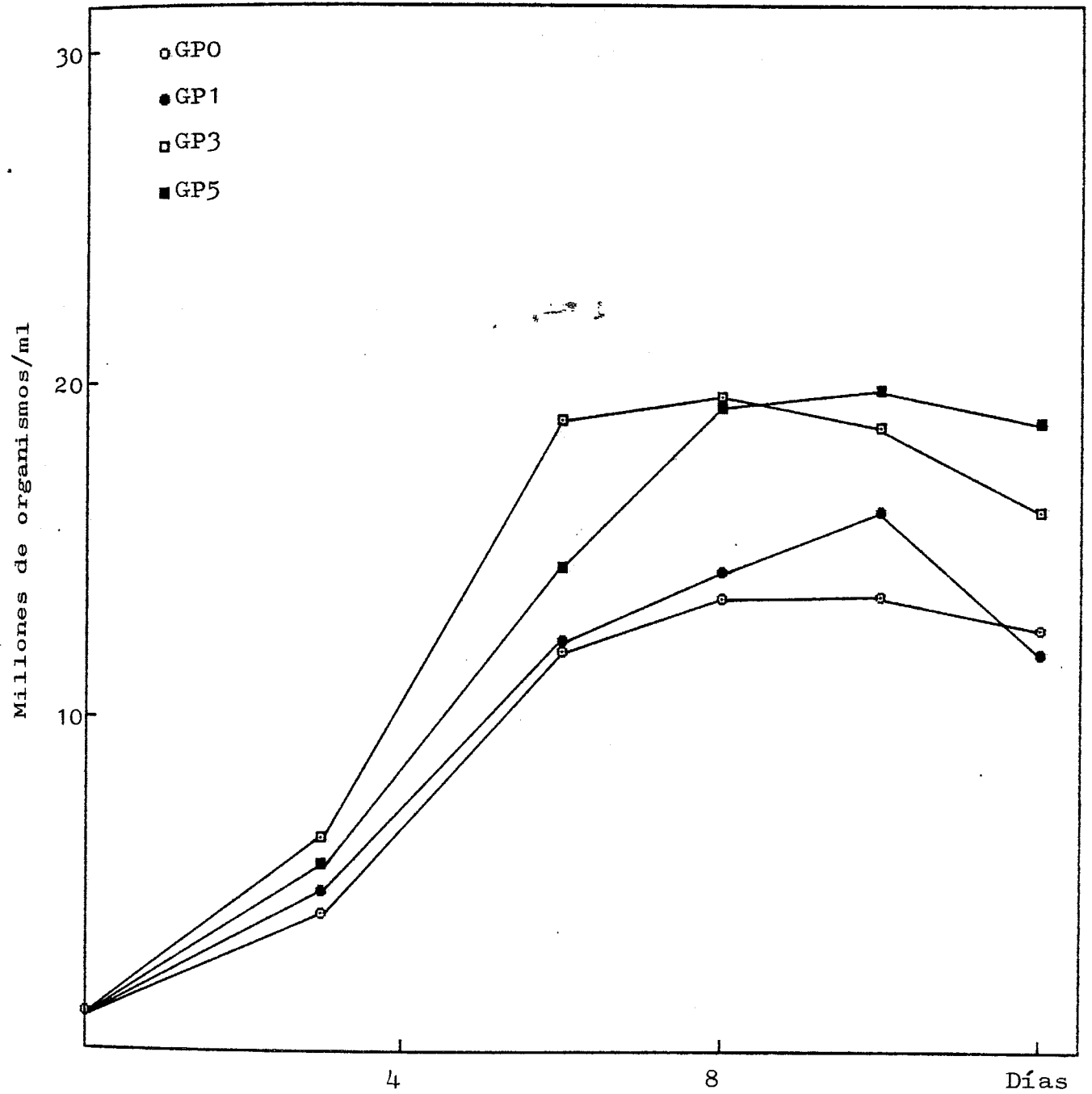
GRUPO C. SUBGRUPO AZUCARES Y ACIDOS ORGANICOS.

Días de cultivo	Medios <sup>a</sup>			
	<u>GPO (8)<sup>b</sup></u>	<u>GP1 (3)</u>	<u>GP3 (3)</u>	<u>GP5 (5)</u>
Inóculo	1,11	1,11	1,11	1,11
3	4,12±0,37	4,80±0,28	6,39±0,39	5,61±0,64
6	12,14±1,21	12,16±2,18	18,91±2,62	14,52±1,41
8	13,62±1,15	14,40±1,74	19,64±2,81	19,36±1,03
10	13,69±1,48	16,21±2,49	18,72±3,33	19,86±3,03
12	12,67±1,36	11,92±1,88	16,17±2,87	18,84±3,10
CM <sup>c</sup>	14,53±1,41	17,20±1,70	20,88±2,16 <sup>*</sup>	22,50±2,21 <sup>**</sup>

Las notas a, b y c, se corresponden con las del cuadro nº 1.

Significación estadística: (\*) P < 0,05; (\*\*) P < 0,01

=====



GRAFICA N° 15.- Crecimiento de T.cruzi en medios de cultivo Grace modificados. Grupo C. Subgrupo Azúcares y Ácidos Orgánicos.

=====

Cuadro nº 16.- PORCENTAJE DE METACICLOGENESIS DE Trypanosoma cruzi EN MEDIOS DE CULTIVO  
GRACE MODIFICADOS, GRUPO C. SUBGRUPO AZUCARES Y ACIDOS ORGANICOS.

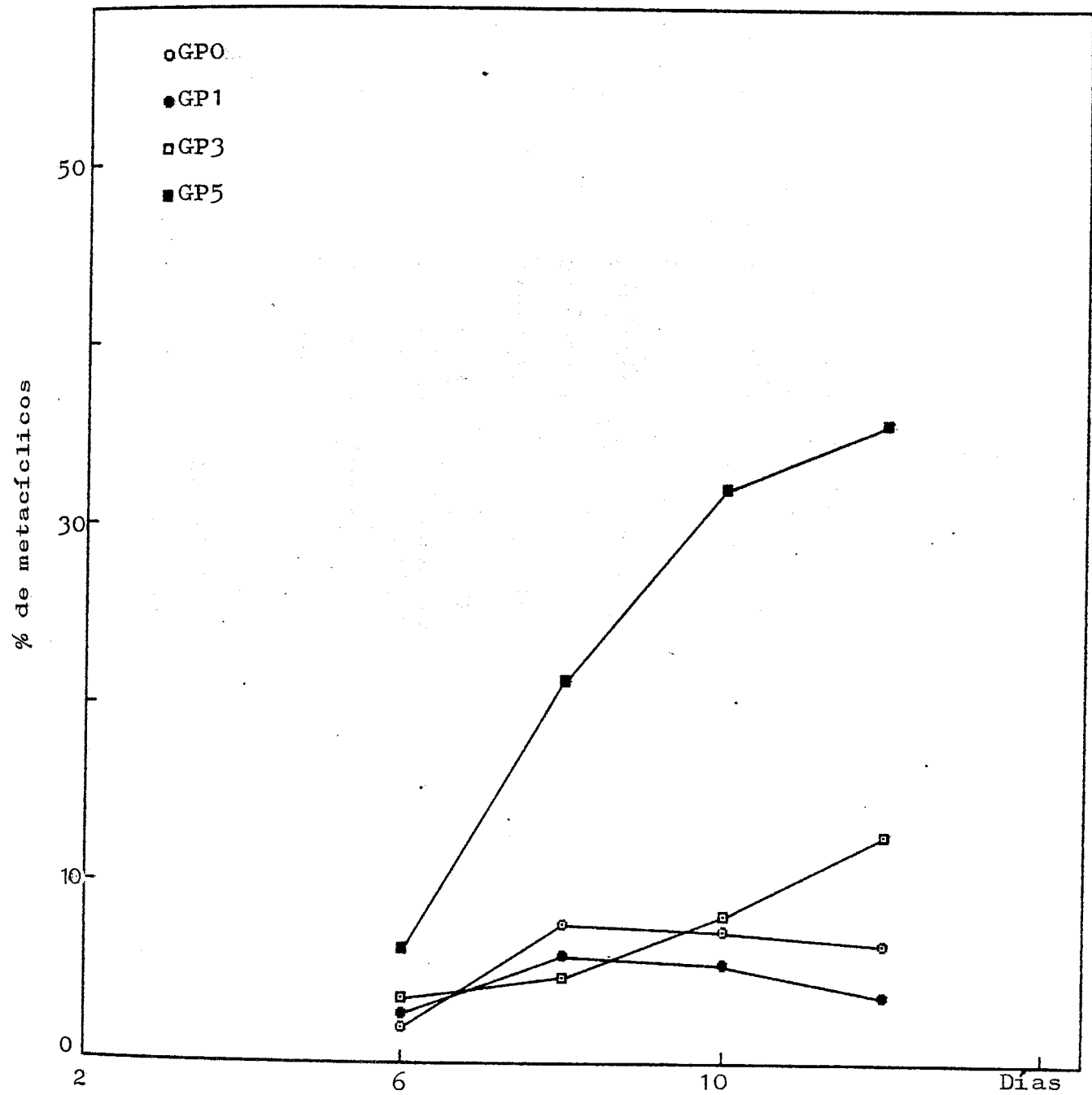
=====

Días de <u>cultivo</u>	Medios <sup>a</sup>			
	<u>GPO (8)<sup>b</sup></u>	<u>GP1 (3)</u>	<u>GP3 (3)</u>	<u>GP5 (5)</u>
Inóculo	-	-	-	-
6	2,0±0,3	2,7±0,5	3,6±0,7	6,4±1,9
8	7,7±2,5	6,0±1,2	4,7±0,3	21,4±4,6
10	7,4±1,4	5,5±0,6	8,2±0,2	32,1±5,7
12	6,6±1,3	3,7±1,0	12,7±1,6	35,8±5,2
MM <sup>c</sup>	10,3±2,2	6,5±0,8	12,7±1,6	36,6±4,7 <sup>****</sup>

Las notas a, b y c, se corresponden con las del cuadro nº 2.

Significación estadística: (\*\*\*\*) P < 0,001.

=====



GRAFICA Nº 16.- Porcentaje de metacicloogénesis de T.cruzi en medios de cultivo Grace modificados. Grupo C. Subgrupo Azúcares y Acidos Orgánicos.

=====

Cuadro n° 17.- CRECIMIENTO DE Trypanosoma cruzi EN MEDIOS DE CULTIVO GRACE MODIFICADOS.

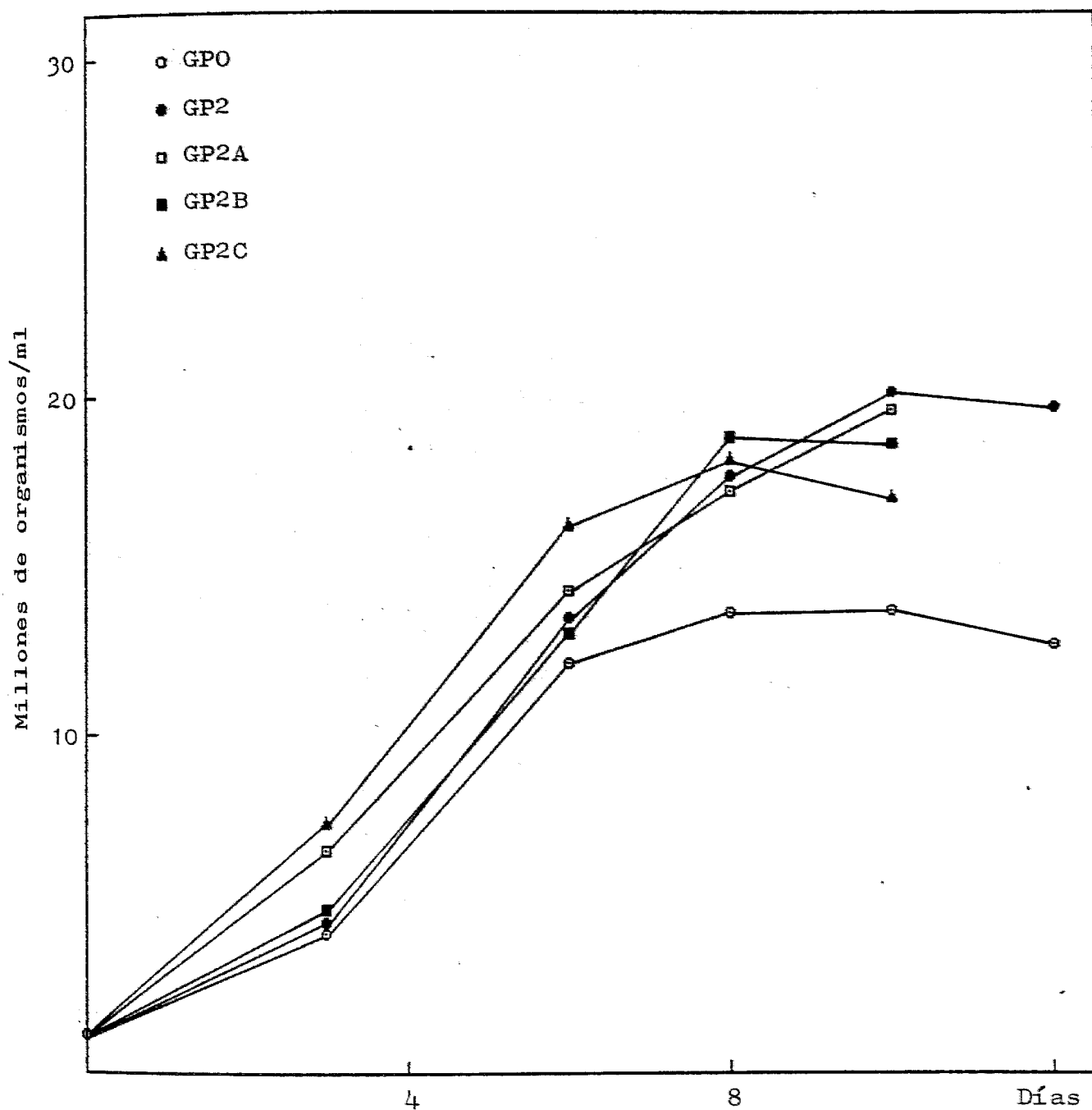
GRUPO C. SUBGRUPO AZUCARES Y ACIDOS ORGANICOS.

Días de cultivo	Medios <sup>a</sup>			
	GP2 (5) <sup>b</sup>	GP2A (3)	GP2B (3)	GP2C (3)
Inóculo	1,11	1,11	1,11	1,11
3	4,46±0,72	6,59±1,33	4,77±0,29	7,41±0,19
6	13,49±2,07	14,25±1,83	13,22±2,06	16,26±3,59
8	17,98±1,83	17,23±2,44	18,77±3,22	18,11±1,87
10	20,14±2,43	19,60±3,73	18,59±2,87	17,01±2,22
CM <sup>c</sup>	20,83±2,15*	20,03±3,62	20,00±2,47	20,56±1,60*

Las notas a, b y c, se corresponden con las del cuadro n° 1.

Significación estadística: (\*) P < 0,05

=====



GRAFICA N° 17.- Crecimiento de F. cruzi en medios de cultivo Gra-  
 ce modificados. Grupo C. Subgrupo Azúcares y Aci-  
 dos Orgánicos.

=====  
 Cuadro nº 18.- PORCENTAJE DE METACICLOGENESIS DE Trypanosoma cruzi EN MEDIOS DE CULTIVO  
 GRACE MODIFICADOS, GRUPO C, SUBGRUPO AZUCARES Y ACIDOS ORGANICOS.  
 =====

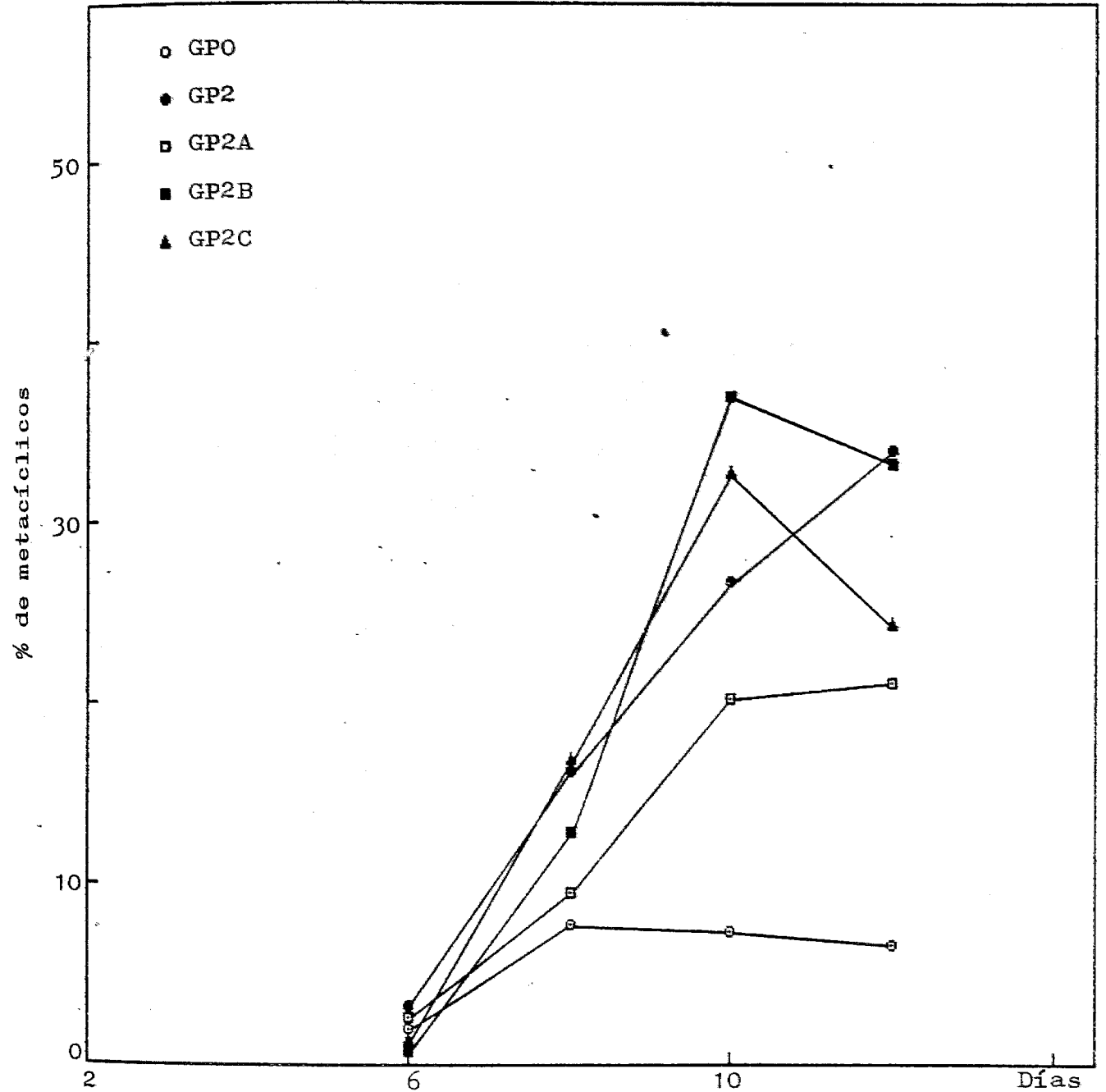
Días de cultivo	Medios <sup>a</sup>			
	<u>GP2 (5)<sup>b</sup></u>	<u>GP2A (3)</u>	<u>GP2B (3)</u>	<u>GP2C (3)</u>
Inóculo	-	-	-	-
6	3,1±1,1	2,4±0,2	1,6±0,4	1,9±0,6
8	16,6±4,2	9,5±1,4	12,9±3,4	16,9±5,1
10	26,8±7,4	20,3±2,5	37,0±3,9	32,8±8,6
12	33,7±5,4	21,1±0,9	33,2±6,8	24,5±6,4
MM <sup>c</sup>	35,1±5,0 <sup>****</sup>	22,0±0,9 <sup>*</sup>	38,3±4,9 <sup>****</sup>	32,8±8,6 <sup>****</sup>

Las notas a, b y c, se corresponden con las del cuadro nº 2.

Significación estadística: (\*) P < 0,05; (\*\*) P < 0,005; (\*\*\*\*) P < 0,001.

=====





GRAFICA Nº 18.- Porcentaje de metacicloogénesis de *T. cruzi* en medios de cultivo modificados. Grupo C. Subgrupo Azúcares y Acidos Orgánicos.

GRUPO D:

En este grupo de medios se conjugan aquéllos con los que mejores resultados se han obtenido hasta el momento.

En los cuadros y gráficas nº 19 y 20, están detallados los resultados experimentales. De ellos se deduce que las curvas de crecimiento son similares a la control (GPO), pero con un incremento en sus valores máximos que sólo es significativo en el caso de GP5 ( $P < 0,05$ ).

En lo relativo a la diferenciación, ésta es superior y significativa en todos los casos frente al control (GPO ClNa<sup>4</sup>,  $P < 0,0002$ ; GP5,  $P < 0,003$  y GP5ClNa<sup>4</sup>,  $P < 0,0002$ ). Al compararlos con GP5 ClNa<sup>4</sup>, todos resultaron ser significativamente inferiores (GPO ClNa<sup>4</sup>,  $P < 0,02$  y GP5,  $P < 0,01$ ).

=====

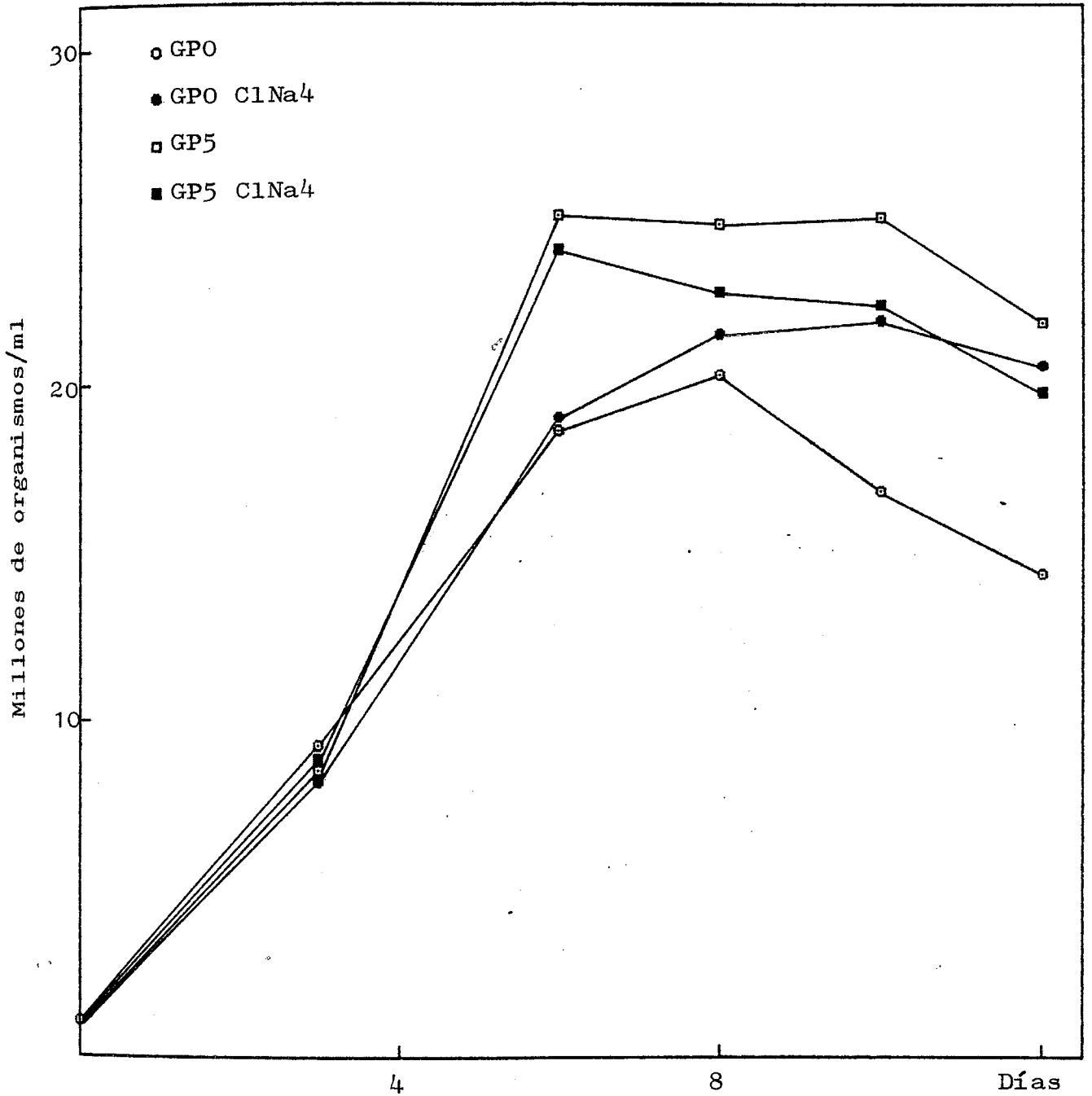
Cuadro nº 19.- CRECIMIENTO DE Trypanosoma cruzi EN MEDIOS DE CULTIVO GRACE MODIFICADOS,  
GRUPO D.

Días de cultivo	Medios <sup>a</sup>			
	GPO (4) <sup>b</sup>	GPO ClNa4(4)	GP5 (3)	GP5 ClNa4(4)
Inóculo	1,09	1,09	1,09	1,09
3	9,09±2,54	8,23±2,23	8,51±2,78	9,00±2,14
6	18,83±2,35	19,00±2,34	25,04±5,03	24,10±3,34
8	20,34±1,92	21,56±1,52	24,77±2,29	22,78±1,48
10	16,85±1,88	21,93±0,47	24,99±1,63	22,38±2,98
12	14,40±1,88	20,62±0,39	21,90±2,58	19,83±2,64
CM <sup>c</sup>	20,60±2,12	26,12±1,59	30,61±3,44 <sup>**</sup>	27,72±3,14

Las notas a, b y c, se corresponden con las del cuadro nº 1.

Significación estadística: (\*) P < 0,05.

=====



GRAFICA N° 19.- Crecimiento de T.cruzi en medios de cultivo Gra-  
ce modificados. Grupo D.

=====

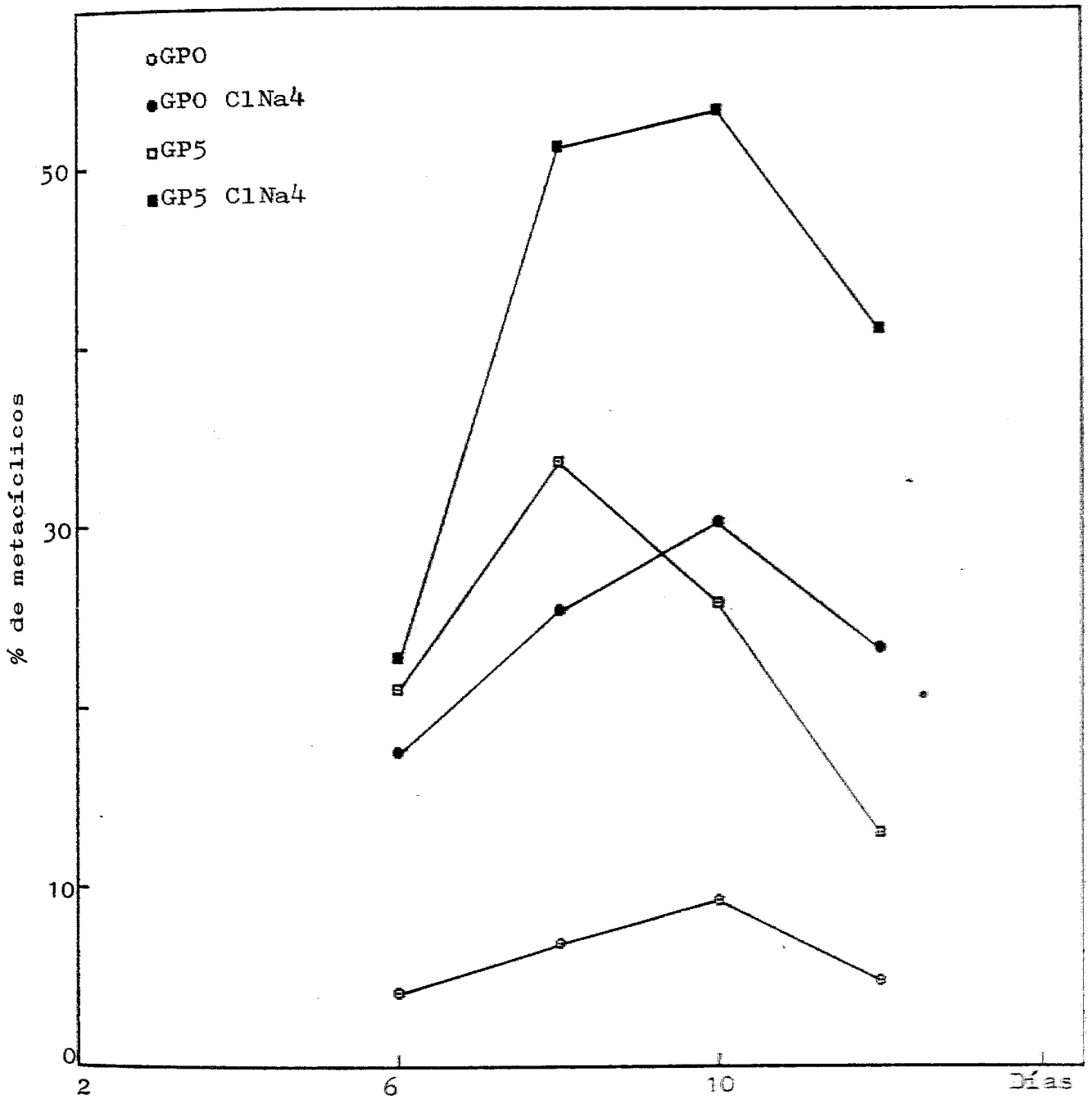
Cuadro nº 20.- PORCENTAJE DE METACICLOGENESIS DE Trypanosoma cruzi EN MEDIOS DE CULTIVO  
GRACE MODIFICADOS. GRUPO D.

Días de cultivo	Medios <sup>a</sup>			
	<u>GPO (4)<sup>b</sup></u>	<u>GPO ClNa4(4)</u>	<u>GP5 (3)</u>	<u>GP5 ClNa4(4)</u>
Inóculo	-	-	-	-
6	4,1±1,1	17,5±5,0	21,0±9,8	22,7±9,3
8	6,9±1,8	25,4±3,0	33,6±2,8	51,1±7,0
10	9,2±3,1	30,2±1,4	25,7±3,4	53,1±5,3
12	4,8±1,9	23,2±5,9	13,0±1,7	41,0±4,9
MM <sup>c</sup>	9,7±2,7	43,3±2,7 <sup>****</sup>	34,9±3,7 <sup>***</sup>	64,5±5,5 <sup>****</sup>

Las notas a, b y c, se corresponden con las del cuadro nº 2.

Significación estadística: (\*\*\*) P < 0,005; (\*\*\*\*) P < 0,001.

=====



GRAFICA N° 20.- Porcentaje de metaciclologénesis de *T. cruzi* en medios de cultivo Grace modificados. Grupo B.

#### 4.2.- ESTUDIO DE LAS POSIBLES MODIFICACIONES INDUCIDAS EN EL MEDIO GRACE (1962)

##### 4.2.1.- ESTUDIO DE LAS MODIFICACIONES EN AZUCARES.

Analizados los azúcares de las muestras, por cromatografía líquida de alta presión, según se indica en el apartado 3.3.1., en todos los casos aparecieron los picos correspondientes a dichos azúcares, apareciendo un nuevo pico, en todas las muestras tratadas, situado en una posición anterior a la fructosa, solapándose con ella cuando la concentración de la sustancia problema era elevada.

El pico correspondiente a la fructosa salía a los 4,9 minutos de la inyección de la muestra, el de la glucosa a los 5,8 minutos y el de la sacarosa, a los 8,8 minutos. El pico problema salía en todas las pruebas a los 4,7 minutos.(Figura nº 1).

Como éste salía siempre, cualquiera que fuese el o los azúcares tratados, sospechamos que se debía a las sustancias añadidas durante el tratamiento y no a la alteración de los sacáridos.

El tratamiento se realizaba con ClH y NaOH, lo que nos hizo suponer que el pico problema podía corresponder al ClNa formado en la reacción entre ambas sustancias.

Al proceder a inyectar en el cromatógrafo una solución de ClNa, se obtuvo un pico a los 4,7 minutos, confirmando así nuestras sospechas.



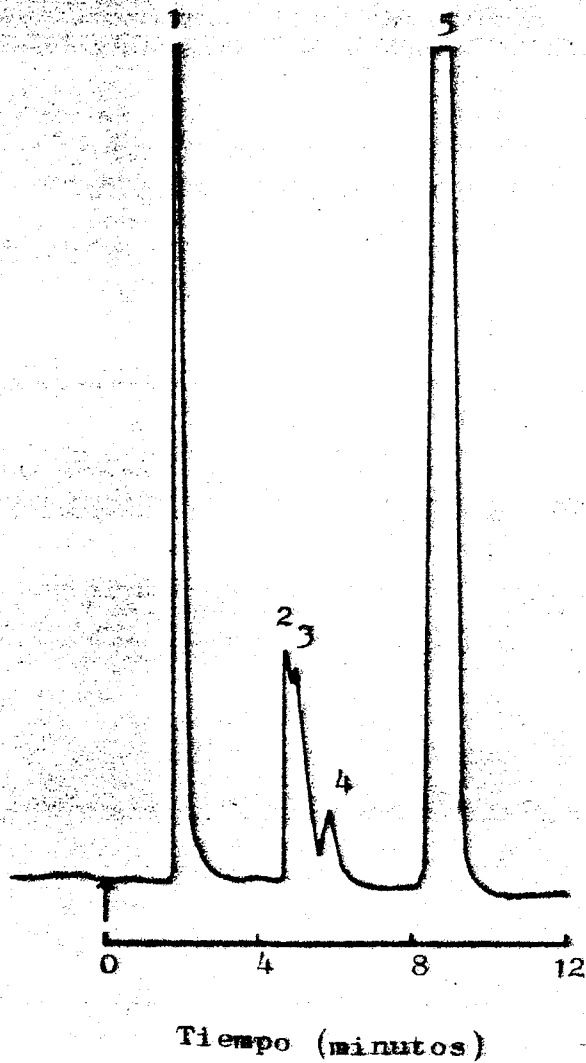


FIGURA N° 1.- Diagrama obtenido por cromatografía líquida de alta presión de una muestra de azúcares tratada.  
1- disolvente; 2- cloruro sódico; 3- fructosa; 4- glucosa; 5- sacarosa. (→) Inyección de la muestra.

#### 4.2.2.- ESTUDIO DE LAS MODIFICACIONES EN AMINOACIDOS.

Los aminoácidos de las muestras de Grace, SBFI y Grace + 10% de SBFI tratadas o no con cambios de pH (OSUNA y col., 1979) fueron determinados en un autoanalyzer de aminoácidos, como se indica en el apartado 3.3.2. (figuras nº 2 y 3).

Los resultados están referidos a la relación de cada aminoácido entre las muestras no tratadas y tratadas, puesto que en todas ellas están sometidos a las mismas condiciones (cuadro nº 21).

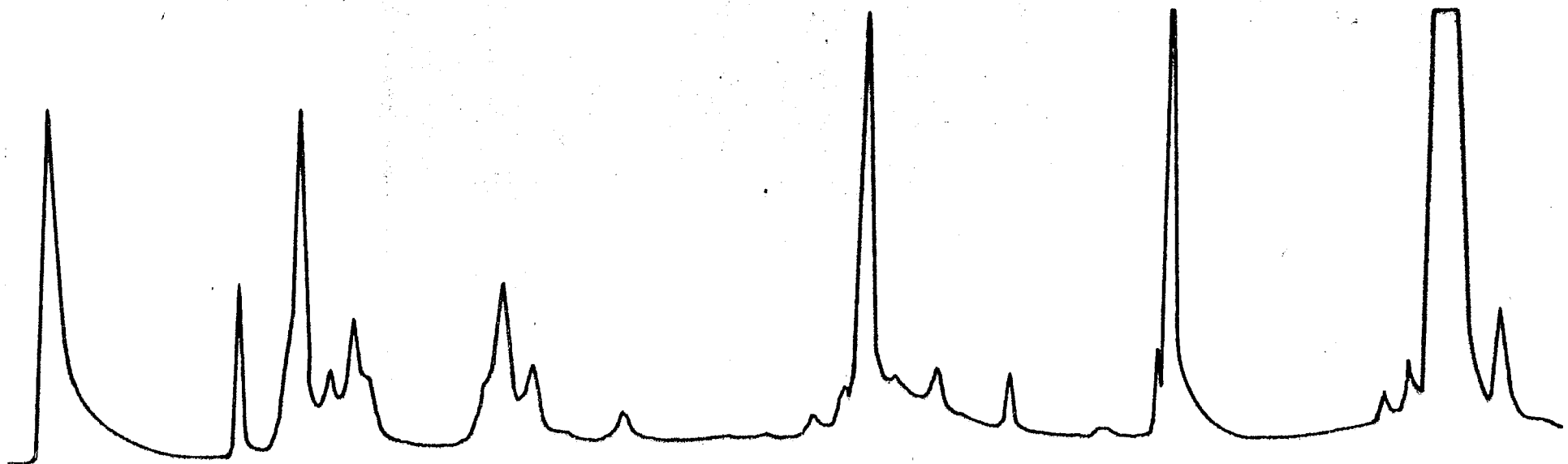


FIGURA N° 2.- Aminograma de una muestra de Grace + 10% SBF1 no tratada y desproteïnizada.

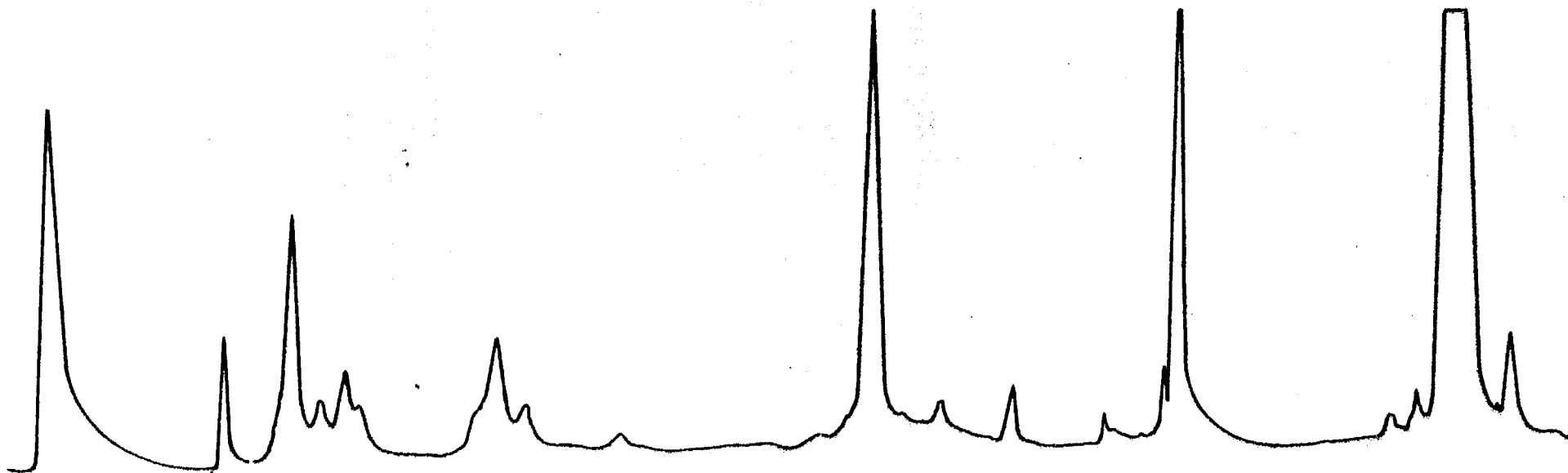


FIGURA N° 3.- Aminograma de una muestra de Grace + 10% SBFI tratada por cambio de pH y desproteinizada.

=====

Cuadro nº 21.- VARIACION EN LA COMPOSICION DE AMINOACIDOS  
EN LAS MUESTRAS ENSAYADAS.

Aminoácido (aa)	<u>% Area del pico del aa no tratado</u>	<u>% Area del pico del aa tratado</u>
Taurina + urea	0,86±0,18	(2) <sup>a</sup>
Ac. aspártico	0,98±0,05	(6)
Hidroxiprolina	1,07±0,20	(2)
Treonina	0,96±0,01	(2)
Serina	1,00±0,07	(6)
Asparragina	0,98±0,07	(4)
Ac. glutámico	1,08±0,08	(6)
Ac. α-aminoadípico	1,03	(1)
Glicina	0,97±0,10	(6)
Alanina	1,00±0,14	(6)
Citrulina		
+ Ac. α-aminobutírico	0,99±0,04	(2)
Valina	1,14±0,12	(5)
Metionina	0,90	(1)
Isoleucina	1,17±0,08	(4)
Leucina	0,95±0,17	(3)
Tirosina	0,95±0,01	(2)
Fenilalanina	0,91±0,04	(5)
β-alanina	1,04±0,09	(6)
Ac. γ-aminobutírico	0,98	(1)
Histidina		
+ 1-metilhistidina	0,97±0,06	(6)
Ornitina	0,87±0,11	(2)
Lisina	1,04±0,16	(5)
Arginina	0,99±0,20	(4)

a) Los resultados son media ± error estándar del nº de muestras que se indica entre paréntesis.

=====

#### 4.3.- DETERMINACION DE TIAMINA Y TIAMINASA.

En trabajos previos en nuestro laboratorio se intuyó que la posible destrucción de la tiamina y del ácido pantoténico del medio Grace modificado por OSUNA y col. (1979) por cambios bruscos de pH, podría ser uno de los factores que intervienen en la metaciclologénesis, dada la mejora del porcentaje de formas metacíclicas en dicho medio.

Para ello, se comprobó primeramente si microorganismos totalmente dependientes de tiamina y ácido pantoténico crecían tanto en medio Grace + 10% de SBF1 como en Grace modificado (OSUNA y col., 1979). Se ha utilizado Lactobacillus fermentium, cepa ATCC 9338, para la primera vitamina y L. plantarum, cepa ATCC e-8014, para la segunda. Ambos crecen en los dos medios, lo que demuestra la presencia de ambas vitaminas en ellos.

Al objeto de conocer si la concentración de tiamina se altera con las modificaciones del medio, se procedió a medirla espectrofluorométricamente (apartado 3.6.2.) observándose que en el medio modificado existe un 40% menos de tiamina que en el no modificado.

Teniendo en cuenta la existencia de trabajos en la bibliografía consultada, en los que, utilizando extractos de redúvidos completos o de algunos de sus órganos, se consigue mejorar el porcentaje de metaciclogénesis en medio Grace + 10% de SBFI, procedimos a determinar si estos extractos podrían tener alguna actividad tiaminasa o similar que eliminara, al menos, parte de la tiamina del medio, actuando, quizás, así en el insecto vector.

#### 4.3.1.- DETECCION ESPECTROFOTOMETRICA DE TIAMINASA I.

La detección espectrofotométrica de actividad tiaminasa I (E.C. 2.5.1.2) (apartado 3.6.1.) en extractos de Rhodnius prolixus (apartado 3.5.) resultó infructuosa, no pudiendo conseguir detectar dicha actividad en un espectrofotómetro Zeiss PM2K, a pesar de utilizar 0,4 mg de proteína/cubeta de 3 ml.

#### 4.3.2.- DETERMINACION ESPECTROFLUOROMETRICA DE TIAMINA

la detección espectrofluorométrica de la tiamina residual tras adición del extracto de Rhodnius proli-xus al medio, (apartado 3.6.2.), transcurrido el tiempo de reacción previsto y utilizando entre 0,06 y 0,20 mg de proteína/ml, condujo a un valor final de tiamina estable, siempre inferior al valor inicial y variable de unas experiencias a otras, cualquiera que fuese el tiempo de la reacción entre 0 segundos y 5 horas.

Cuando lo que se varió fue la concentración inicial de tiamina, a igualdad de tiempo de reacción (30 minutos), ésta disminuyó en su concentración final en todos los casos.

Cuando el extracto fue calentado a 100°C durante 30 minutos, tuvo una actividad inferior (aproximada -mente, del 56% del extracto original).



#### 4.4.- DETERMINACION DE AMONIO EN AMASTIGOTES.

Los resultados obtenidos según la técnica detallada en el apartado 3.7.1., indican que la producción de amonio por las formas amastigotas obtenidas en cultivos de células Vero, según se especifica en el apartado 3.2.3 es de

$$17,02 \pm 2,08 \mu\text{g NH}_4^+ / 10^8 \text{ organismos} / 24 \text{ horas}$$

(media  $\pm$  error estándar de la media de 3 experiencias dobles).

4.5.- DETERMINACION DE LA NATURALEZA DE LOS CRISTALES  
APARECIDOS EN LOS MEDIOS DE CULTIVO.

Las microfotografías nº 1 y 2 de los cristales obtenidos en los cultivos de Trypanosoma cruzi, en las condiciones indicadas en el apartado 3.8., han sido realizadas con el microscopio electrónico de barrido Philips 515 y la microfotografía nº 3 de una macia cristalina, fue tomada en el mismo frasco de cultivo en el que se originaron los cristales, con la ayuda de un microscopio invertido Olympus provisto de equipo fotográfico.

El análisis químico previo demostró la presencia de iones fosfato y amonio en la composición de dichos cristales, mientras que el análisis con un microanalizador "Edax" puso de manifiesto la existencia de fósforo y magnesio en una concentración relativa en peso de 1,384 a 1,000, respectivamente.

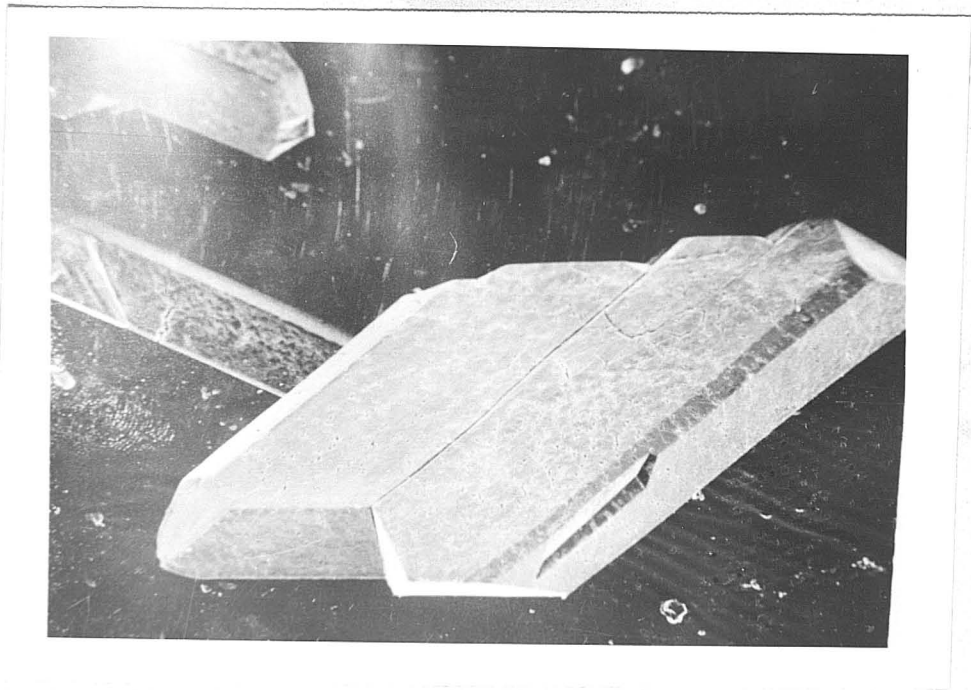
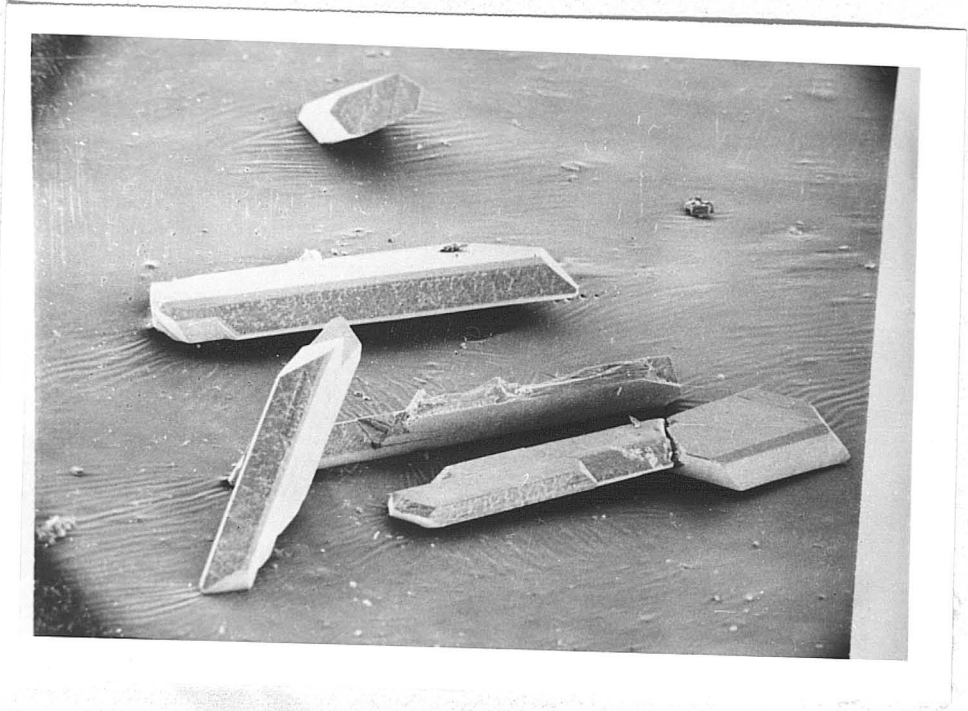
Del análisis de difracción de rayos X realizado en un difractómetro Philips Pw 1730, se obtuvo el diagrama de la fig. 4 que se identifica con el descrito en la carta 15-762 de A.S.T.M. (BERRY, 1974) correspondien-

te a la estruvita, un fosfato doble de amonio y magnesio hexahidratado, cuya fórmula es  $\text{PO}_4(\text{NH}_4)\text{Mg}\cdot 6\text{H}_2\text{O}$ .

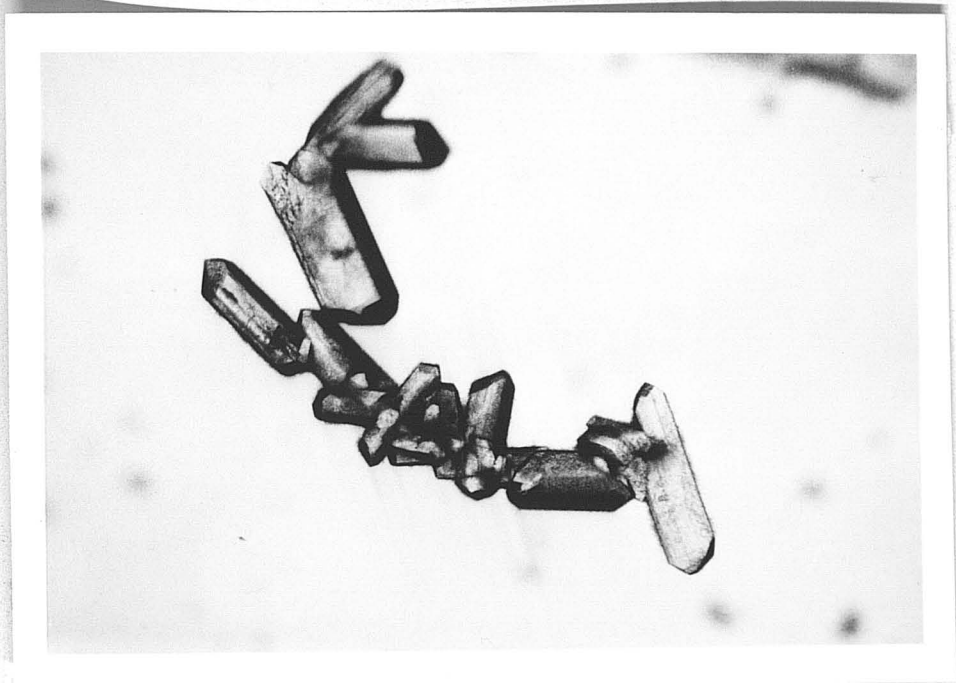
Los estudios posteriores con los medios de cultivo para conocer la excreción de amonio de los tripanosomas a lo largo del cultivo, en las condiciones especificadas en el apartado 3.8., dieron los resultados detallados en el cuadro 22 y gráfica 21 para el medio Grace + 100 meq ClNa/1, ya que no se observaron diferencias con los otros medios probados.

En el momento que se observaba la precipitación de los cristales, entre los días 24 y 45 post-inoculación, se procedía a medir los distintos parámetros estudiados del cultivo. Así se pudo comprobar que el número de organismos/ml jamás rebasaba los  $15 \times 10^6$ , el pH siempre era igual o superior a 7,0, la glucosa no fue detectable y el amonio siempre se encontraba en una concentración superior a 0,4 mg/ml.

Es preciso indicar que los cultivos que fueron abiertos para tomar las muestras, fueron incapaces de precipitar cristales tras mantenerse cerrados 60 días despues de la última toma de muestras.



Microfotografías nº 1 y 2.- Cristales obtenidos en cultivos de T. cruzi en medio Grace de OSUNA y col (1979).



Microfotografía nº 3.- Macia cristalina observada en un cultivo de T. cruzi en medio Grace + 100 meq de ClNa/l.

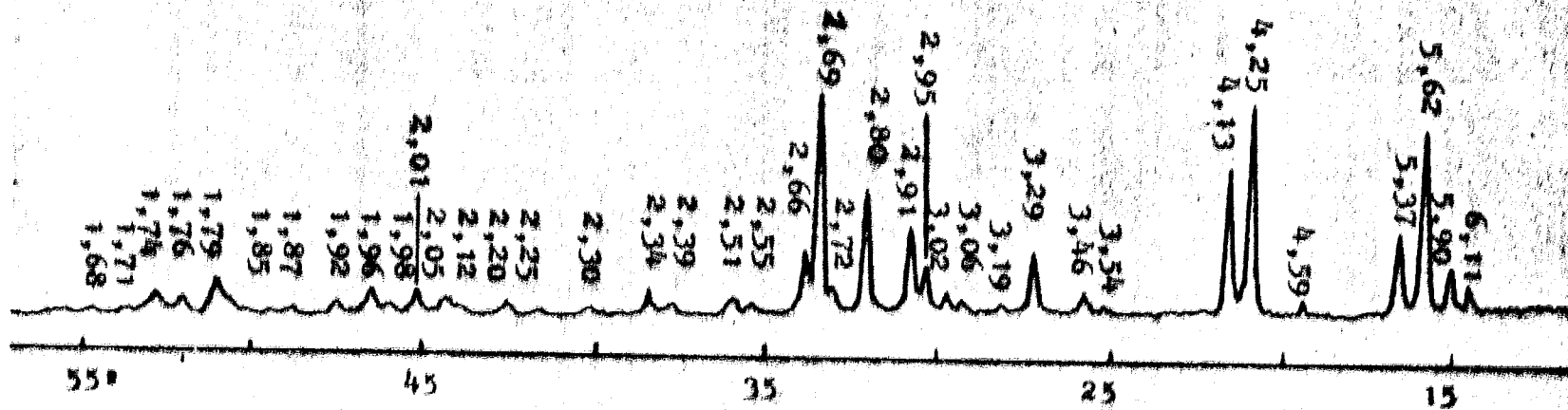


FIGURA N<sup>o</sup> 4.- Diagrama de difracción de rayos X de los cristales precipitados por T. cruzi en medio Grace modificado de OSUNA y col. (1984).

=====  
 Cuadro nº 22.- EVOLUCION DE UN CULTIVO DE Trypanosoma cruzi EN MEDIO GRACE + 100 meq ClNa/l<sup>a</sup>

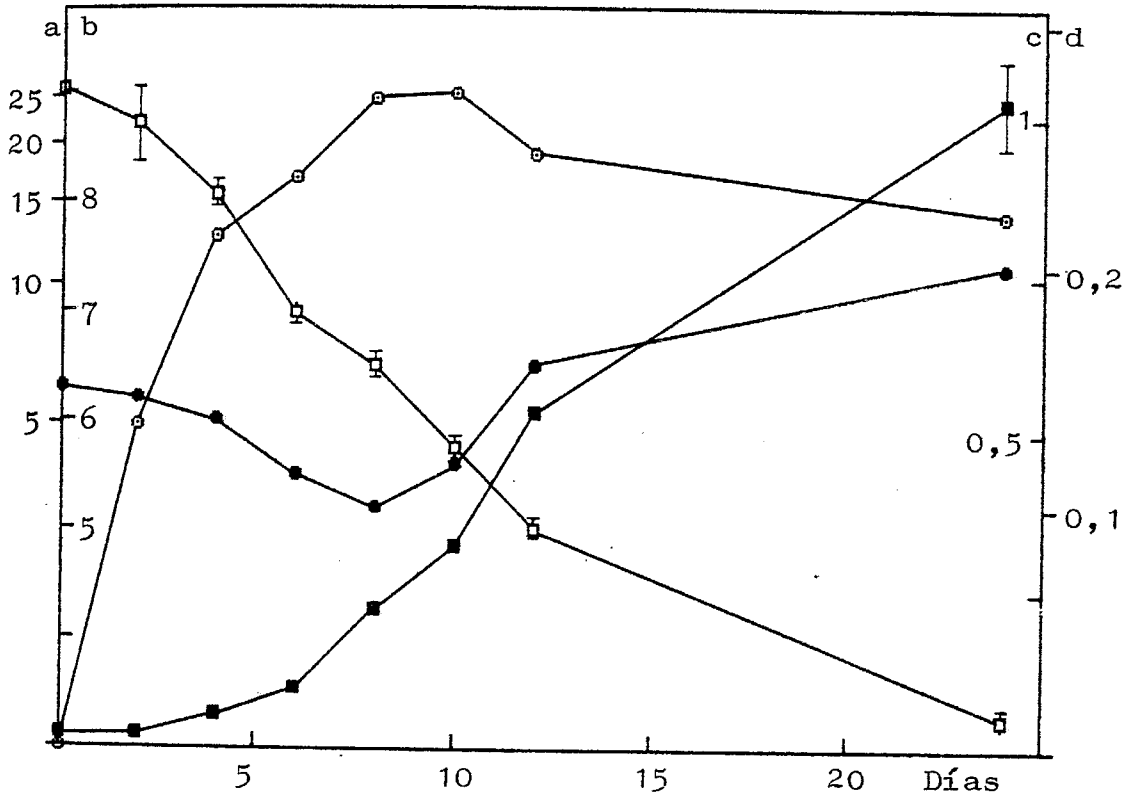
<u>Día</u>	<u>Crecimiento</u> <sup>b</sup>	<u>Glucosa(mg/ml)</u>	<u>pH</u>	<u>Amonio(µg/ml)</u>
0	1,00	1,05±0,09	6,3	0,75±0,14
2	4,93±1,22	0,99±0,12	6,2±0,1	5,55±0,49
4	12,62±2,01	0,88±0,04	6,0±0,1	13,58±1,14
6	16,80±3,17	0,69±0,02	5,5±0,1	25,00±1,74
8	24,90±2,83	0,61±0,04	5,2±0,1	57,58±3,94
10	25,60±3,90	0,48±0,03	5,6±0,1	83,85±2,74
12	18,85±2,89	0,35±0,03	6,5±0,1	139,88±5,23
24	14,03±0,93	0,05±0,01	7,4±0,1	268,00±35,10

a) Los resultados son media ± error estándar de 4 experiencias.

b) El crecimiento se expresa en millones de organismos/ml.

=====

GRAFICA Nº 21.- Evolución de un cultivo de T.cruzi en medio Grace+100 meq ClNa/l.



a) Crecimiento (o) en millones de organismos/ml.

b) pH (●)

c) Concentración de glucosa (□) en mg/ml.

d) Concentración de amonio (■) en mg/ml.



4.6.- PRODUCCION DE  $^{14}\text{CO}_2$  A PARTIR DE D-(U- $^{14}\text{C}$ )-GLUCOSA.

4.6.1.- PRODUCCION DE  $^{14}\text{CO}_2$  POR FORMAS EPIMASTIGOTAS Y METACICLICAS DE Trypanosoma cruzi.

Se determina la producción de  $^{14}\text{CO}_2$  a partir de D-(U- $^{14}\text{C}$ )-glucosa en matraces con distinto número de tripanosomas (apartado 3.10.) con el fin de comprobar si existe algún tipo de cooperación en el consumo de glucosa entre los parásitos, independientemente de la edad de los mismos en cultivo.

Los resultados quedan reflejados en el cuadro nº 23 y gráfica nº 22.

Por el método de los mínimos cuadrados se determinan las rectas y las parábolas de regresión y sus coeficientes de correlación (R), tanto en el caso de las formas epimastigotas como en el de las metacíclicas, obteniéndose las siguientes ecuaciones:

Para epimastigotes:  $y = 3,77x^2 + 73,54x + 281,97$  (R=1,00)

Para metacíclicos:  $y = 87,61x + 319,02$  (R= 0.91)

Al extrapolar la parábola y la recta hasta un valor de "x" =  $100 \times 10^6$  tripanosomas/matraz, obtenemos un valor de "y" = 45,3 y 9,1 nmoles de  $^{14}\text{CO}_2$  liberados/hora por epimastigotes y metacíclicos, respectivamente.

#### 4.6.2.- EVOLUCION DE LA PRODUCCION DE $^{14}\text{CO}_2$ EN UN CULTIVO DE EPIMASTIGOTES DE Trypanosoma cruzi.

Se ensaya la producción de  $^{14}\text{CO}_2$  a partir de D-(U- $^{14}\text{C}$ )-glucosa en formas epimastigotas en determinados momentos de su evolución, cultivadas como se indica en el apartado 3.2.1.

Se hacen dos grupos de experiencias: una con un número de tripanosomas fijo ( $20 \times 10^6$ ) y otro con los tripanosomas que se encuentran en un volumen constante del medio de cultivo en el día de la determinación. Con ello, pretendemos conocer si la densidad de organismos en el cultivo puede influir a efectos de cooperatividad en el consumo de glucosa y si los parásitos estudiados varían, a lo largo del cultivo, su capacidad de consumir glucosa.

De ambas experiencias se comprueban resultados similares en los que se ve una clara disminución de la

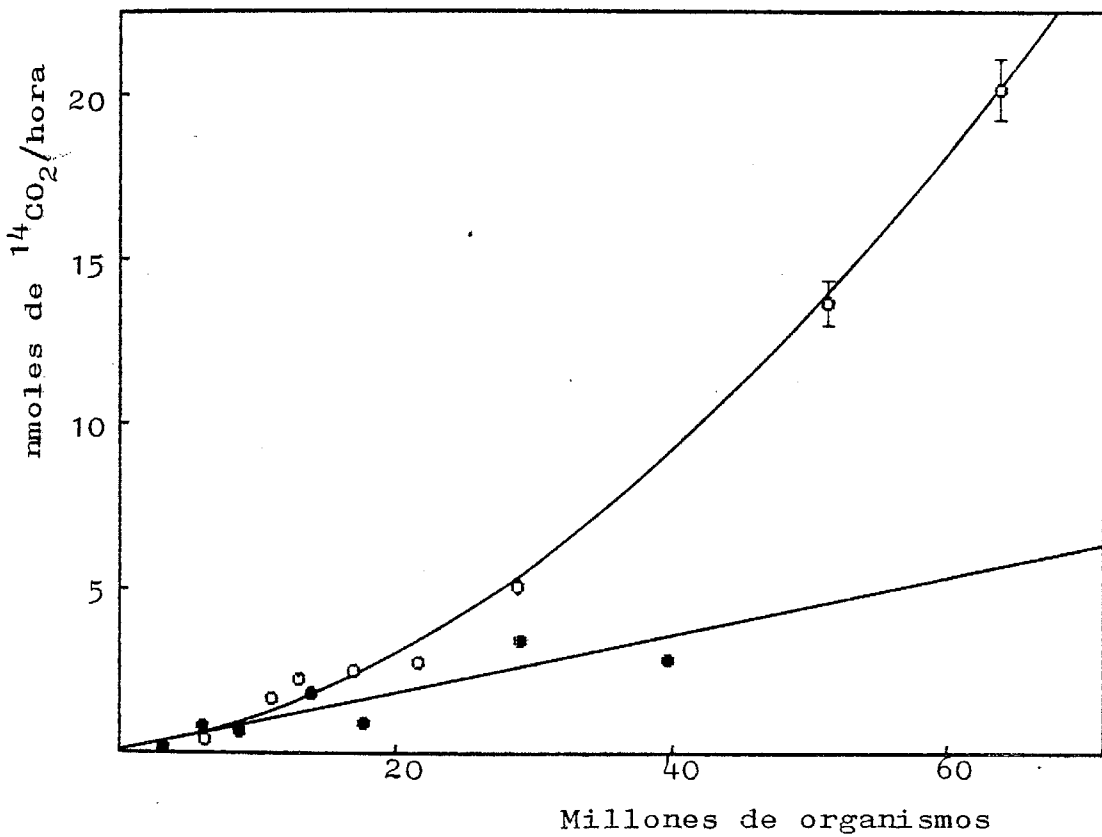
producción de  $^{14}\text{CO}_2$  a partir del momento en que el cultivo alcanza la fase estacionaria (cuadro nº 24).

=====  
 Cuadro nº 23.- PRODUCCION DE  $^{14}\text{CO}_2$  POR FORMAS EPIMASTIGOTAS Y METACICLICAS DE Trypano-  
soma cruzi, A PARTIR DE D-(U- $^{14}\text{C}$ )-GLUCOSA, RECOLECTADAS EN EL 8º Y 9º  
 DIAS DE CULTIVO, RESPECTIVAMENTE.

Epimastigotes		Metacíclicos	
Nº de organismos	pmoles de $^{14}\text{CO}_2/\text{h}$	Nº de organismos	pmoles de $^{14}\text{CO}_2/\text{h}$
$6,2 \times 10^6$	$704 \pm 40$ (4) <sup>a</sup>	$3,2 \times 10^6$	$473 \pm 49$ (3) <sup>a</sup>
$11,0 \times 10^6$	$1925 \pm 128$ (5)	$6,1 \times 10^6$	$1123 \pm 222$ (2)
$13,0 \times 10^6$	$2498 \pm 263$ (3)	$8,8 \times 10^6$	$1012 \pm 188$ (2)
$17,0 \times 10^6$	$2777 \pm 312$ (4)	$14,0 \times 10^6$	$2121 \pm 198$ (2)
$21,6 \times 10^6$	$3020 \pm 251$ (2)	$17,6 \times 10^6$	$1240 \pm 85$ (2)
$28,8 \times 10^6$	$5379 \pm 548$ (4)	$29,0 \times 10^6$	$3760 \pm 66$ (2)
$51,2 \times 10^6$	$13948 \pm 1340$ (4)	$39,6 \times 10^6$	$3188 \pm 153$ (2)
$64,0 \times 10^6$	$20467 \pm 1846$ (3)		

a) Los resultados son media  $\pm$  error estándar. El número de determinaciones se indica entre paréntesis.

=====



GRAFICA N° 22.- Producción de  $^{14}\text{CO}_2$  por formas epimastigotas (o) y metacíclicas (●) de T.cruzi, a partir de D-(U- $^{14}\text{C}$ )-glucosa.

=====  
 Cuadro nº 24.- EVOLUCION DE LA PRODUCCION DE  $^{14}\text{CO}_2$  POR FORMAS EPIMASTIGOTAS DE Trypano-  
soma cruzi, A PARTIR DE D-(U- $^{14}\text{C}$ )-GLUCOSA, A LO LARGO DE SU CULTIVO.  
 =====

Edad del cultivo en días	Organismos/ml en cultivo ( $\times 10^6$ )	pmoles de $^{14}\text{CO}_2$ /hora/ $10^6$ organismos	
		A	B
6	2,7 $\pm$ 0,3 <sup>c</sup>	95 $\pm$ 4 <sup>c</sup>	94 $\pm$ 8 <sup>c</sup>
8	3,8 $\pm$ 0,7	108 $\pm$ 23	137 $\pm$ 33
10	4,8 $\pm$ 0,1	143 $\pm$ 30	131 $\pm$ 19
12	10,0 $\pm$ 1,4	192 $\pm$ 23	134 $\pm$ 19
14	16,8 $\pm$ 0,2	68 $\pm$ 22	21 $\pm$ 12
17	20,3 $\pm$ 0,8	59 $\pm$ 5	14 $\pm$ 9
20	15,4 $\pm$ 0,7	23 $\pm$ 11	84 $\pm$ 15

(A) = Experiencia realizada con  $20 \times 10^6$  tripanosomas/matraz.

(B) = Experiencia realizada con los tripanosomas recogidos de 3 ml de medio/matraz.

(c) = Los resultados corresponden a los valores medios  $\pm$  error estándar de dos determina-  
 ciones duplicadas.

=====

#### 4.7.- DETERMINACIONES ENZIMATICAS

##### 4.7.1.- HEXOKINASA (E. C. 2.7.1.2)

Se ensaya la actividad específica de la enzima hexokinasa como se indica en el apartado 3.13.1.

Los valores de la actividad frente a la concentración de sustrato vienen detallados en el cuadro nº 25 y en la gráfica nº 23, observándose una cinética de tipo hiperbólico, tanto en las formas epimastigotas como en las metacíclicas.

Para calcular los valores de la velocidad máxima ( $V_{m\acute{a}x}$ ) y de la constante de Michaelis ( $K_m$ ) se utiliza la ecuación de Eadie-Hofstee (apartado 3.13.10.), empleando para ello los valores medios de la velocidad hallados a las concentraciones de sustrato probadas y de terminándose las rectas de regresión, por el método de los mínimos cuadrados, obteniéndose las siguientes ecuaciones:

$$\text{Para epimastigotes: } y = -0,025x + 98,80 \quad (R= 0,96)$$

$$\text{Para metacíclicos: } y = -0,035x + 53,73 \quad (R= 0,97)$$

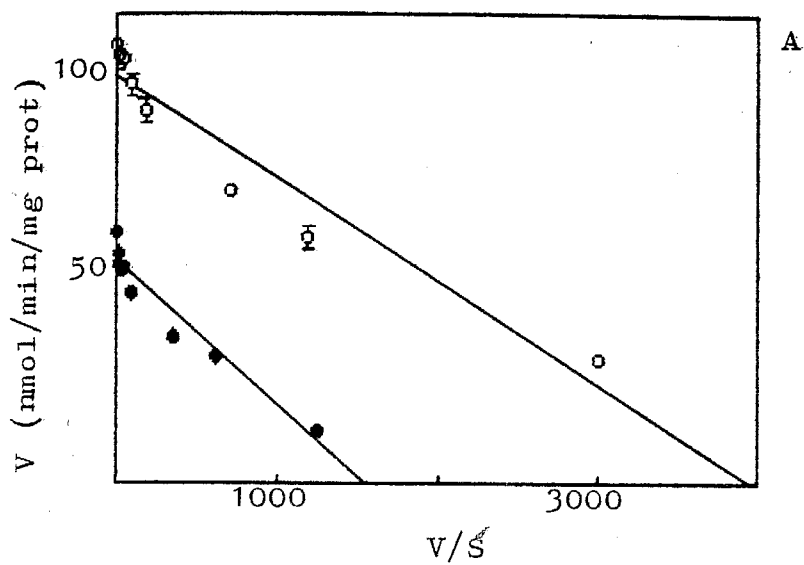
siendo el valor de  $K_m$  de  $25 \mu M$  para los epimastigotes y de  $35 \mu M$  para los metacíclicos, mientras que  $V_{m\acute{a}x}$  es de  $98,80$  nmoles de sustrato convertido/minuto/mg de proteína, para los primeros, y de  $53,73$  nmoles de sustrato con vertido/minuto/mg de proteína, para los segundos.



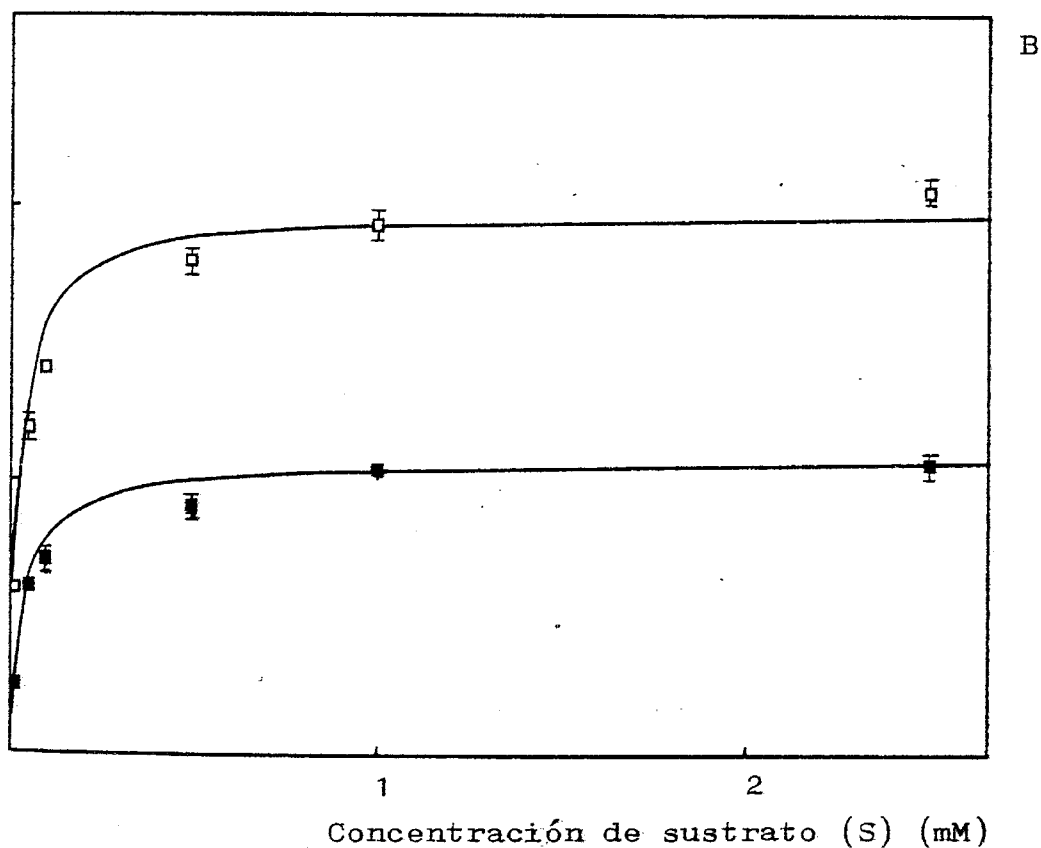
=====  
 Cuadro nº 25.- ACTIVIDAD ESPECIFICA DEL ENZIMA HEXOKINASA (E. C. 2.7.1.2) EN FOR-  
 MAS EPIMASTIGOTAS Y METACICLICAS DE Trypanosoma cruzi.  
 =====

<u>Concentración de sustrato (mM)</u>	<u>Actividad específica (a)</u>	
	<u>Epimastigotes</u>	<u>Metacíclicos</u>
0,01	29,97±1,90(2)	12,53±1,29(2)
0,05	59,47±4,91(2)	30,63±2,10(4)
0,1	70,72±0,59(3)	35,56±3,39(3)
0,5	89,83±4,59(3)	45,74±3,07(3)
1,0	96,48±4,62(3)	51,86±2,43(3)
2,5	*102,68±4,57(3)	52,89±4,40(2)
5,0	103,51±3,86(3)	55,61±2,99(3)
15,0	106,30±7,33(3)	60,88±0,23(2)

=====  
 (a) = Los resultados corresponden a los valores medios ± error estándar, expresa-  
 dos en nmoles de sustrato transformado/minuto/mg proteína. El número de de-  
 terminaciones duplicadas se indica entre paréntesis.  
 =====



Actividad específica (V) (mmol/min/mg prot)



GRAFICA Nº 23.- Actividad hexokinasa en las formas epimastigotas (o, □) y metacíclicas (●, ■) de T.cruzi. A: Representación de Eadie-Hofstee. B: Desarrollo cinético de la actividad enzimática (V versus S).

#### 4.7.2.- FOSFOFRUCTOKINASA (E. C. 2.7.1.11)

La actividad específica de la enzima fosfofructokinasa se determina como se indica en el apartado 3.13.2.

Los valores experimentales de esta actividad vienen detallados en el cuadro nº 26 y en la gráfica nº 24, de donde se observa que la cinética es de tipo hiperbólico a lo largo del rango de concentraciones usados.

Se ha empleado la ecuación de Eadie-Hofstee para el cálculo de los valores de  $V_{m\acute{a}x}$  y  $K_m$ , utilizando para ello los valores medios de actividad encontrados a las concentraciones de sustrato ensayadas, excepto aquellos que se desvían excesivamente (0,01 mM para epimastigotes y 0,01 mM y 0,05 mM para metacíclicos), determinándose seguidamente las rectas de regresión, por el método de los mínimos cuadrados, obteniéndose las siguientes ecuaciones:

Para epimastigotes:  $y = - 0,29x + 40,27$  (R = 0,97)

de donde  $K_m = 0,29$  mM y  $V_{m\acute{a}x} = 40,27$  nmoles de sustrato transformado/minuto/mg de proteína.

Para metacíclicos:  $y = - 0,15x + 13,87$  (R = 1,00)

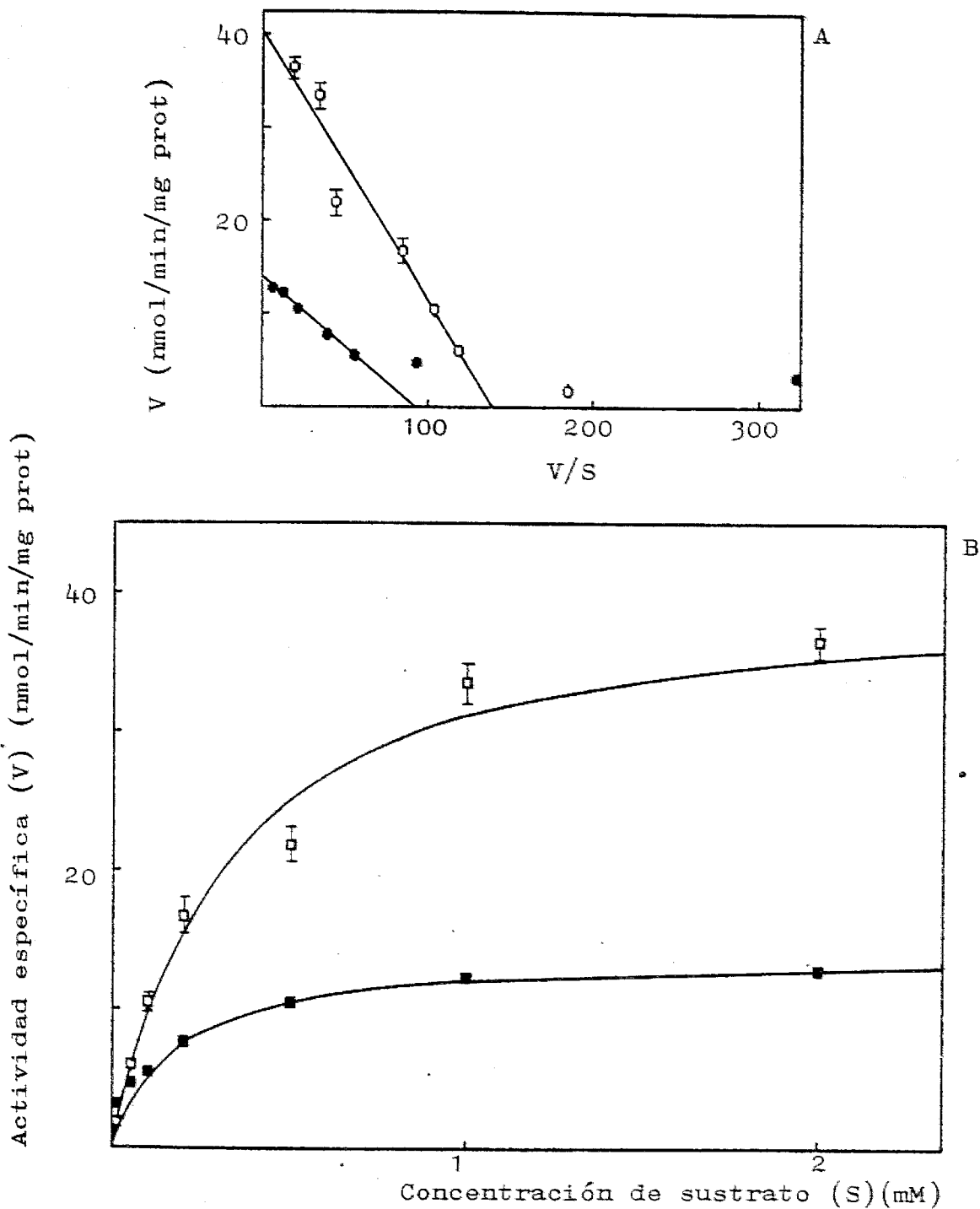
de donde  $K_m = 0,15$  mM y  $V_{m\acute{a}x} = 13,87$  mmoles de sustrato transformado/minuto/mg de proteína.

=====  
 Cuadro nº 26.- ACTIVIDAD ESPECIFICA DEL ENZIMA FOSFOFRUCTOKINASA (E. C. 2.7.1.11)  
 EN FORMAS EPIMASTIGOTAS Y METACICLICAS DE Trypanosoma cruzi,  
 =====

Concentración de sustrato (mM)	Actividad específica (a)	
	Epimastigotes	Metacíclicos
0,01	1,85±0,36(3)	3,23±0,68(2)
0,05	5,94±0,93(3)	4,65±0,71(2)
0,1	10,43±1,32(3)	5,55±0,47(3)
0,2	16,72±2,58(3)	7,67±0,05(2)
0,5	21,91±2,63(3)	10,44±0,51(3)
1,0	33,46±2,78(2)	12,29±0,52(2)
2,0	36,42±2,32(2)	12,87±0,54(2)

(a) = Los resultados corresponden a los valores medios ± error estándar, expresados en nmoles de sustrato transformado/minuto/mg proteína. El número de determinaciones duplicadas se indica entre paréntesis.

=====



GRAFICA N° 24.- Actividad fosfofructokinasa en las formas epimastigotas (o, □) y metacíclicas (●, ■) de T. cruzi. A: Representación de Eadie-Hofstee. B: Desarrollo cinético de la actividad enzimática (V versus S).

#### 4.7.3.- FRUCTOSA-1,6-BISFOSFATASA (E. C. 3.1.3.11)

Se ensaya la actividad específica del enzima fructosa-1,6-bisfosfatasa como se indica en el apartado 3.13.3., en las formas epimastigotas de T. cruzi.

Esta actividad se determina a dos pH distintos (7,2 y 9,5), así como a dos temperaturas diferentes (28 y 37°C) a la concentración de 0,05 mM de sustrato, obteniéndose los mejores resultados a pH 7,2 y a 37°C (cuadro nº 27).

Seguidamente se determina la actividad, a pH 7,2 y 37°C, a distintas concentraciones de sustrato (cuadro nº 28 y gráfica nº 25) observándose una cinética típica de inhibición por exceso de sustrato a partir de concentraciones superiores a 0,075 mM de fructosa-1,6-bisfosfato, siendo del 46% a 0,25 mM y del 100% a 10 mM.

Para calcular los valores de la  $V_{m\acute{a}x}$  y de la  $K_m$  se utiliza la ecuación de Eadie-Hofstee empleando para ello los valores medios hallados entre las concentraciones de sustrato de 0,005 mM y 0,075 mM, excluyendo las que comportaban inhibición por sustrato y la de 0,025 mM. La recta de regresión, determinada por el método

do de los mínimos cuadrados, es la siguiente:

$$y = - 0,0070x + 3,03 \quad (R = 1,00)$$

de donde  $V_{\text{máx}} = 3,03$  nmoles de sustrato transformado/minuto/mg de proteína y  $K_m = 7,0 \mu\text{M}$ .

En las formas metacíclicas se ensayó esta actividad, a pH 7,2 y a 37°C, obteniéndose un valor de 1,46 nmoles de sustrato transformado/minuto/mg de proteína, a una concentración de D-fructosa-1,6-bisfosfato de 0,075 mM, observándose una inhibición del 19% a concentración 0,25 mM.



=====

Cuadro nº 27.- EFECTO DEL pH Y DE LA TEMPERATURA  
 SOBRE LA ACTIVIDAD ESPECIFICA DEL  
 ENZIMA FRUCTOSA-1,6-BISFOSFATASA  
 (E. C. 3.1.3.11) EN FORMAS EPIMAS-  
 TIGOTAS DE Trypanosoma cruzi.

---

<u>pH</u>	<u>Temperatura</u>	<u>% Actividad específica(a)</u>
7,2	37°C	100
7,2	28°C	66
9,5	37°C	48
9,5	28°C	40

---

(a) = Las condiciones se indican en el apartado  
 3.13.3. La concentración de sustrato es de 0,05mM.  
 Los resultados son media de dosdeterminaciones  
 duplicadas.

=====

=====

Cuadro nº 28.- ACTIVIDAD ESPECIFICA DEL ENZIMA  
FRUCTOSA-1,6-BISFOSFATASA (E. C.  
3.1.3.11) EN FORMAS EPIMASTIGOTAS  
DE Trypanosoma cruzi.

---

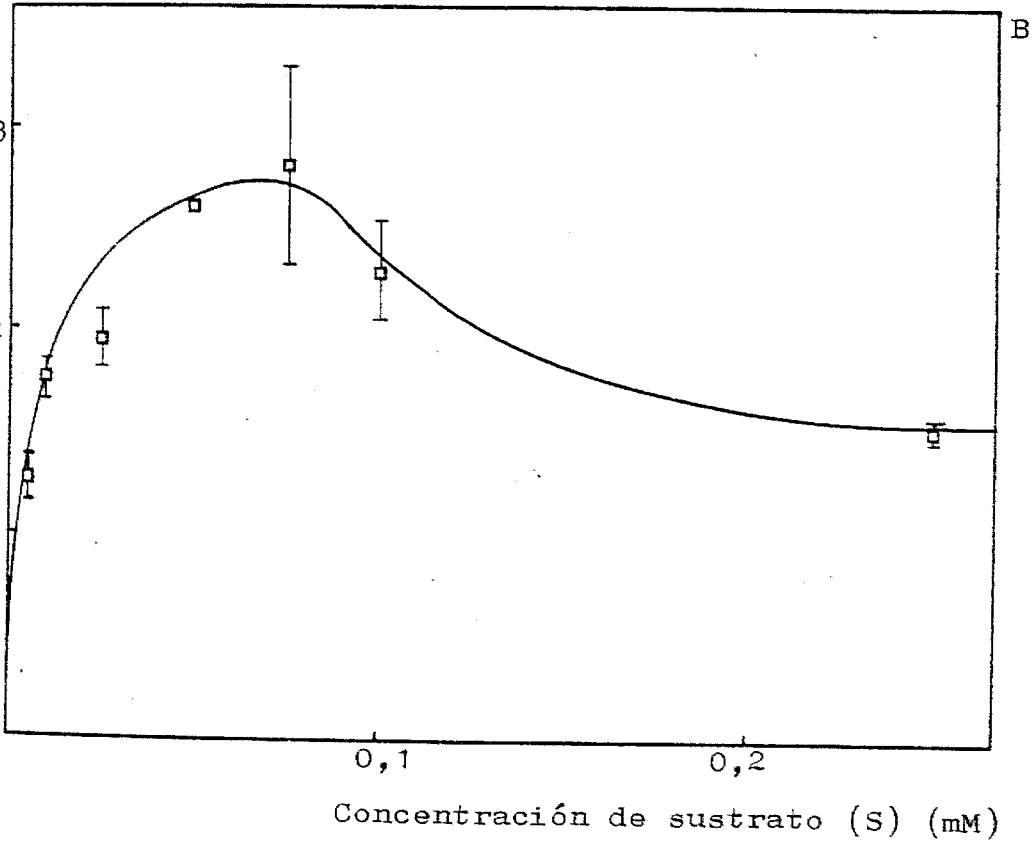
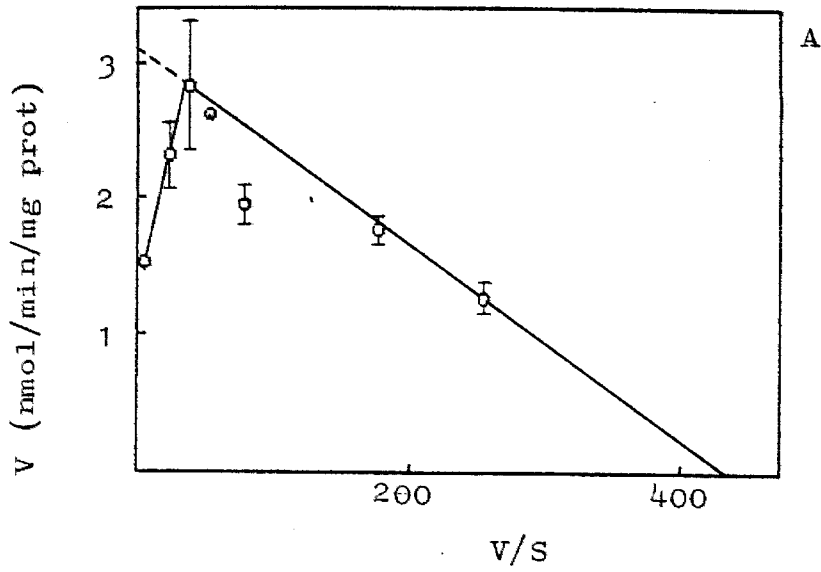
<u>Concentración de</u> <u>sustrato (mM)</u>	<u>Actividad</u> <u>específica (a)</u>
0,005	1,27±0,22(3)
0,010	1,76±0,20(2)
0,025	1,95±0,28(2)
0,050	2,61±0,05(2)
0,075	2,82±0,96(3)
0,100	2,30±0,49(2)
0,250	1,52±0,10(3)

---

(a) = Los resultados corresponden a los valores  
medios ± error estándar, expresados en nmo-  
les de sustrato convertido/minuto/mg de pro-  
teína. El número de determinaciones duplica-  
das se indica entre paréntesis.

=====

Actividad específica (V) (nmol/min/mg prot)



GRAFICA Nº 25.- Actividad fructosa-1,6-bisfosfatasa en las formas epimastigotas (o.□) de cultivo de Trypanosoma cruzi. A: Representación de Eadie-Hofstee. B: Desarrollo cinético de la actividad enzimática (V versus S).

#### 4.7.4.- PIRUVATO KINASA (E. C. 2.7.1.40)

Se determina la actividad específica del enzima piruvato kinasa como se indica en el apartado 3.13.4.

La velocidad de la reacción a distintas concentraciones de sustrato es determinada (cuadro nº 29 y gráfica nº 26), observándose una cinética de tipo sigmoideal tanto para las formas epimastigotas como para las metacíclicas, aunque en éstas es menos acusada.

Para el cálculo de  $V_{m\acute{a}x}$  y  $K_m$ , se emplean los valores medios de velocidad hallados a las concentraciones de sustrato ensayadas, excepto aquellos que se desvían de la recta por efecto de la sigmoicidad de la curva de saturación (0,1 y 0,2 mM para epimastigotes y 0,05 y 0,1 mM para metacíclicos), determinándose las rectas de regresión:

Para epimastigotes:  $y = - 0,61x + 38,57$  ( $R = 0,94$ )

de donde  $K_m = 0,61$  mM y  $V_{m\acute{a}x} = 38,57$  nmoles de sustrato convertido/minuto/mg de proteína.

Para metacíclicos:  $y = - 0,41x + 41,89$  ( $R = 0,99$ )

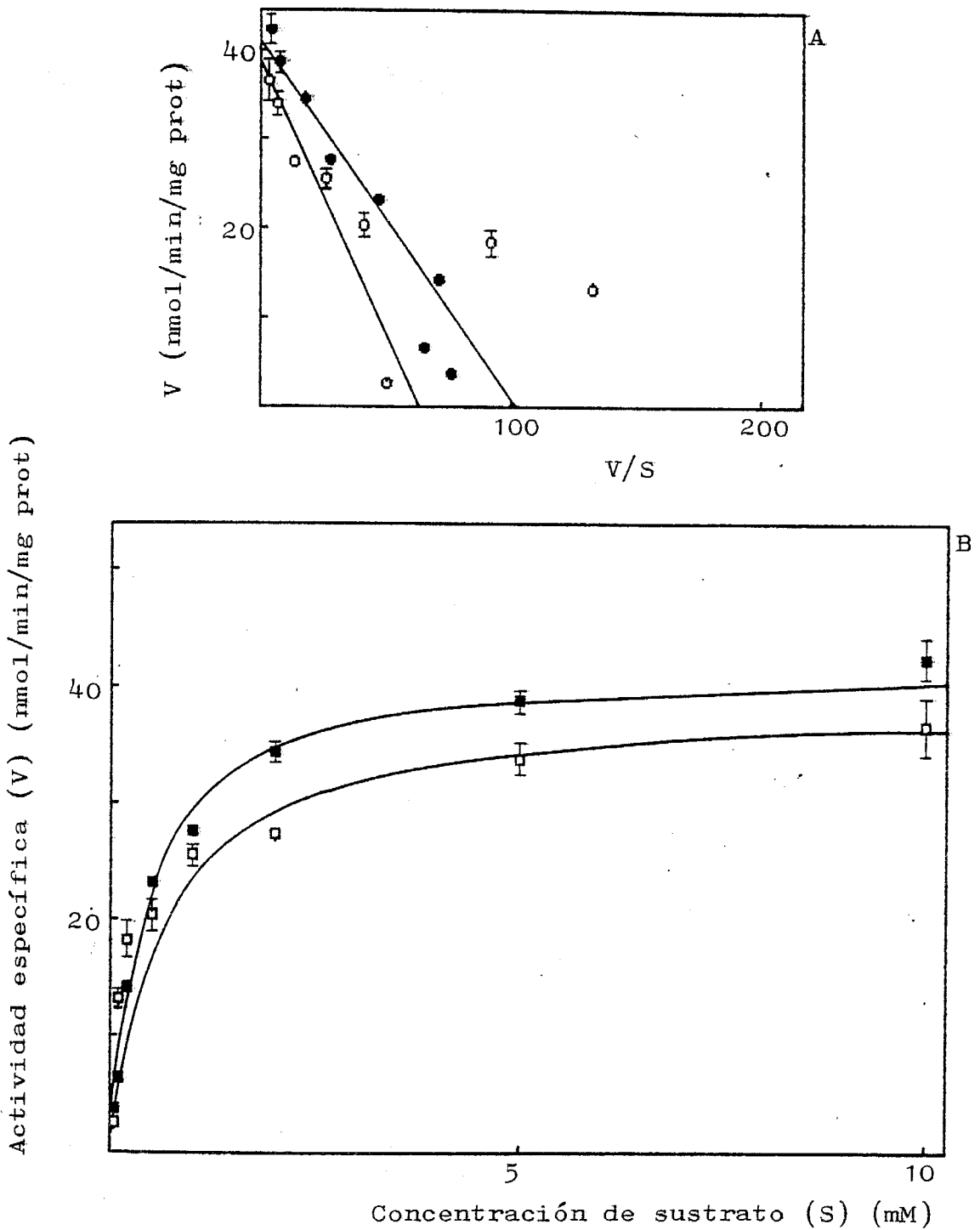
de donde  $K_m = 0,41$  mM y  $V_{m\acute{a}x} = 41,89$  nmoles de sustrato transformado/minuto/mg de proteína.

=====  
 Cuadro nº 29.- ACTIVIDAD ESPECIFICA DEL ENZIMA PIRUVATO KINASA (E. C. 2.7.1.40) EN  
 FORMAS EPIMASTIGOTAS Y METACICLICAS DE Trypanosoma cruzi.  
 =====

Concentracion de sustrato (mM)	Actividad específica (a)	
	Epimastigotes	Metacíclicos
0,05	2,51±0,05(2)	3,80±0,40(2)
0,1	13,26±1,32(2)	6,47±0,19(2)
0,2	18,30±2,98(2)	14,12±0,64(3)
0,5	20,37±2,64(4)	23,24±0,62(3)
1,0	25,54±1,83(3)	27,62±0,70(3)
2,0	27,37±0,51(3)	34,44±1,53(3)
5,0	33,88±2,54(3)	38,73±1,79(3)
10,0	36,51±4,80(3)	42,42±3,42(2)

(a) = Los resultados corresponden a los valores medios ± error estándar, expresados en nmoles de sustrato transformado/minuto/mg proteína. El número de determinaciones duplicadas se indica entre paréntesis.

=====



GRAFICA Nº 26.- Actividad piruvato kinasa en las formas epimastigotas (○, □) y metacíclicas (●, ■) de *T. cruzi*. A: Representación de Eadie-Hofstee. B: Desarrollo cinético de la actividad enzimática (V versus S).

#### 4.7.5.- GLUCOSA-6-FOSFATO DESHIDROGENASA (E. C. 1.1.1.49)

La actividad específica del enzima glucosa-6-fosfato deshidrogenasa se ensaya por el método descrito en el apartado 3.13.5.

Los valores, calculados experimentalmente, de esta actividad vienen especificados en el cuadro nº 30 y en la gráfica nº 27, en donde se observa la cinética de tipo hiperbólico a lo largo del rango de concentraciones usado, tanto en las formas epimastigotas como en las metacíclicas.

Se observó que cuando la reacción enzimática se iniciaba con el sustrato, la velocidad de la misma era inferior en un 49,7% a la iniciada con el extracto enzimático. Ante esto se decidió iniciar siempre la reacción con el extracto.

Los valores de  $K_m$  y  $V_{máx}$  son calculados con la ayuda de la ecuación de Eadie-Hofstee, utilizando para ello los valores medios de la actividad encontrados a las concentraciones probadas de sustrato (excepto 0,01 mM para epimastigotes), determinándose las rectas de regresión, por el método de los mínimos cuadrados, obteniéndose

se las ecuaciones siguientes:

Para epimastigotes:  $y = - 0,21x + 139,37$  (R = 0,99)

Para metacíclicos:  $y = - 0,75x + 66,15$  (R = 0,95)

siendo el valor de Km para epimastigotes de 0,21 mM y para metacíclicos de 0,75 mM, mientras que para los primeros la V<sub>máx</sub> es de 139,37 mmoles de sustrato convertido/minuto/mg de proteína, para los segundos es de 66,15 mmoles de sustrato utilizado/minuto/mg de proteína.



=====

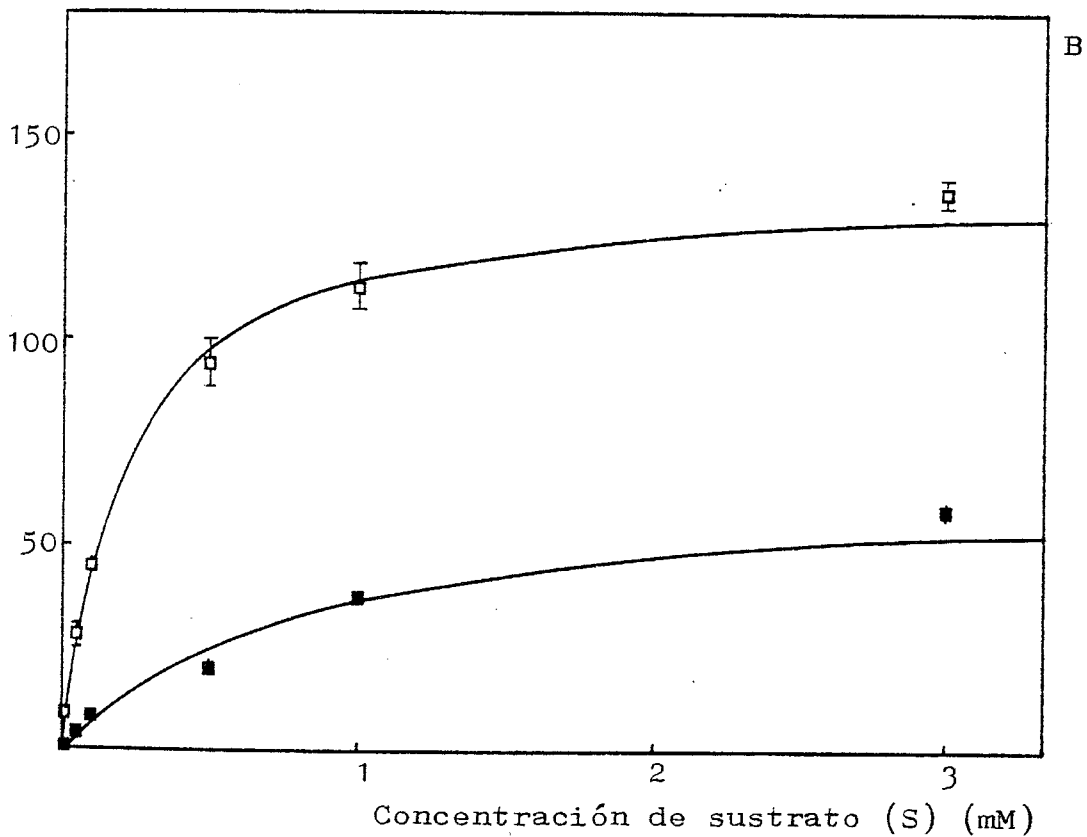
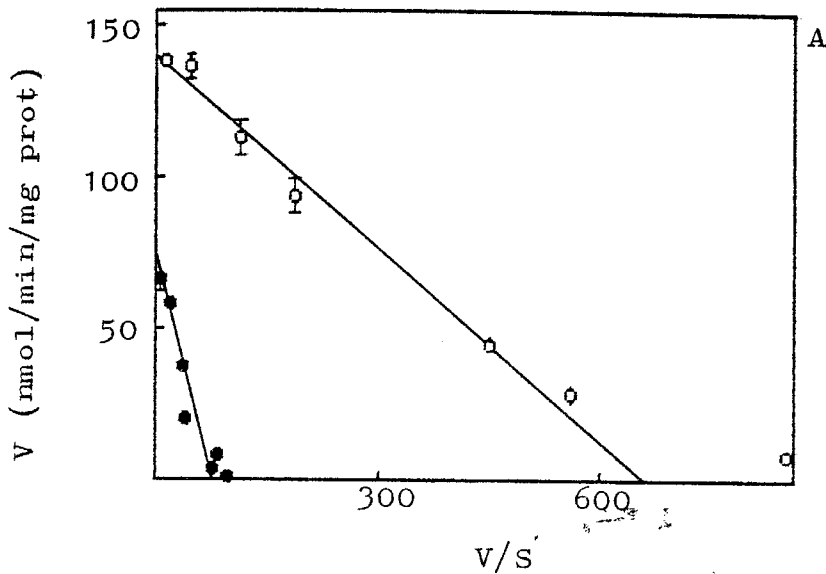
Cuadro nº 30.- ACTIVIDAD ESPECÍFICA DEL ENZIMA GLUCOSA-6-FOSFATO DESHIDROGENASA  
(E. C. 1.1.1.49) EN FORMAS EPIMASTIGOTAS Y METACÍCLICAS DE Trypano-  
soma cruzi.

Concentración de sustrato (mM)	Actividad específica (a)	
	Epimastigotes	Metacíclicos
0,01	8,57± 0,94(3)	0,95±0,27(2)
0,05	27,95± 5,40(3)	3,82±0,27(2)
0,1	44,97± 3,29(3)	8,20±2,09(3)
0,5	94,04±11,32(3)	20,33±1,13(2)
1,0	112,83±11,30(3)	37,14±1,58(3)
3,0	136,14± 6,35(3)	58,42±3,91(3)
10,0	138,33± 3,80(3)	65,95±7,18(4)

(a) = Los resultados corresponden a los valores medios ± error estándar, expresados en nmoles de sustrato transformado/minuto/mg proteína. El número de determinaciones duplicadas se indica entre paréntesis.

=====

Actividad específica (V) (nmol/min/mg prot)



GRAFICA Nº 27.- Actividad glucosa-6-fosfato deshidrogenasa en las formas epimastigotas (o, □) y metacíclicas (●, ■) de T.cruzi. A: Representación de Eadie-Hofstee. B: Desarrollo cinético de la actividad enzimática (V versus S).

#### 4.7.6.- CITRATO SINTASA (E. C. 4.1.3.7)

Se determina la actividad específica del enzima citrato sintasa como se indica en el apartado 3.13.6.

Los valores de las actividades específicas frente a la concentración de oxalacetato (cuadro nº 31 y gráficas nº 28 y 29) y frente a la de acetil-coenzima A (cuadro nº 32 y gráficas nº 30 y 31) muestran una cinética de tipo hiperbólico, tanto en las formas epimastigotas como en las metacíclicas.

Cuando la concentración de oxalacetato era variable, se fijaba la de acetil-coenzima A en 0,3 mM, mientras que cuando era ésta la variable, se fijaba la de oxalacetato en 0,5 mM, siguiendo la técnica descrita por SREERE (1969).

Los valores de  $V_{m\acute{a}x}$  y  $K_m$  son calculados en base a la ecuación de Eadie-Hofstee, empleando para ello los valores medios de actividad hallados a las concentraciones de sustrato ensayadas (excepto a los valores máximos de concentración de los dos sustratos), determinándose las rectas de regresión, por el método de los mínimos cuadrados, obteniéndose las siguientes ecuaciones:

A) Concentración variable de oxalacetato.

- Para epimastigotes:  $y = - 0,0046x + 24,68$  ( $R= 0,94$ )

de donde  $K_m = 4,6 \mu\text{M}$  y  $V_{\text{máx}} = 24,68$  nmoles de sustrato utilizado/minuto/mg de proteína.

- Para metacíclicos:  $y = - 0,0041x + 252,85$  ( $R= 1,00$ )

de donde  $K_m = 4,1 \mu\text{M}$  y  $V_{\text{máx}} = 252,85$  nmoles de sustrato transformado/minuto/mg de proteína.

B) Concentración variable de acetil-coenzima A.

- Para epimastigotes:  $y = - 0,0049x + 23,33$  ( $R= 0,95$ )

de donde  $K_m = 4,9 \mu\text{M}$  y  $V_{\text{máx}} = 23,33$  nmoles de sustrato transformado/minuto/mg de proteína.

- Para metacíclicos:  $y = - 0,036x + 281,60$  ( $R= 0,99$ )

de donde  $K_m = 3,6 \mu\text{M}$  y  $V_{\text{máx}} = 281,60$  nmoles de sustrato transformado/minuto/mg de proteína.

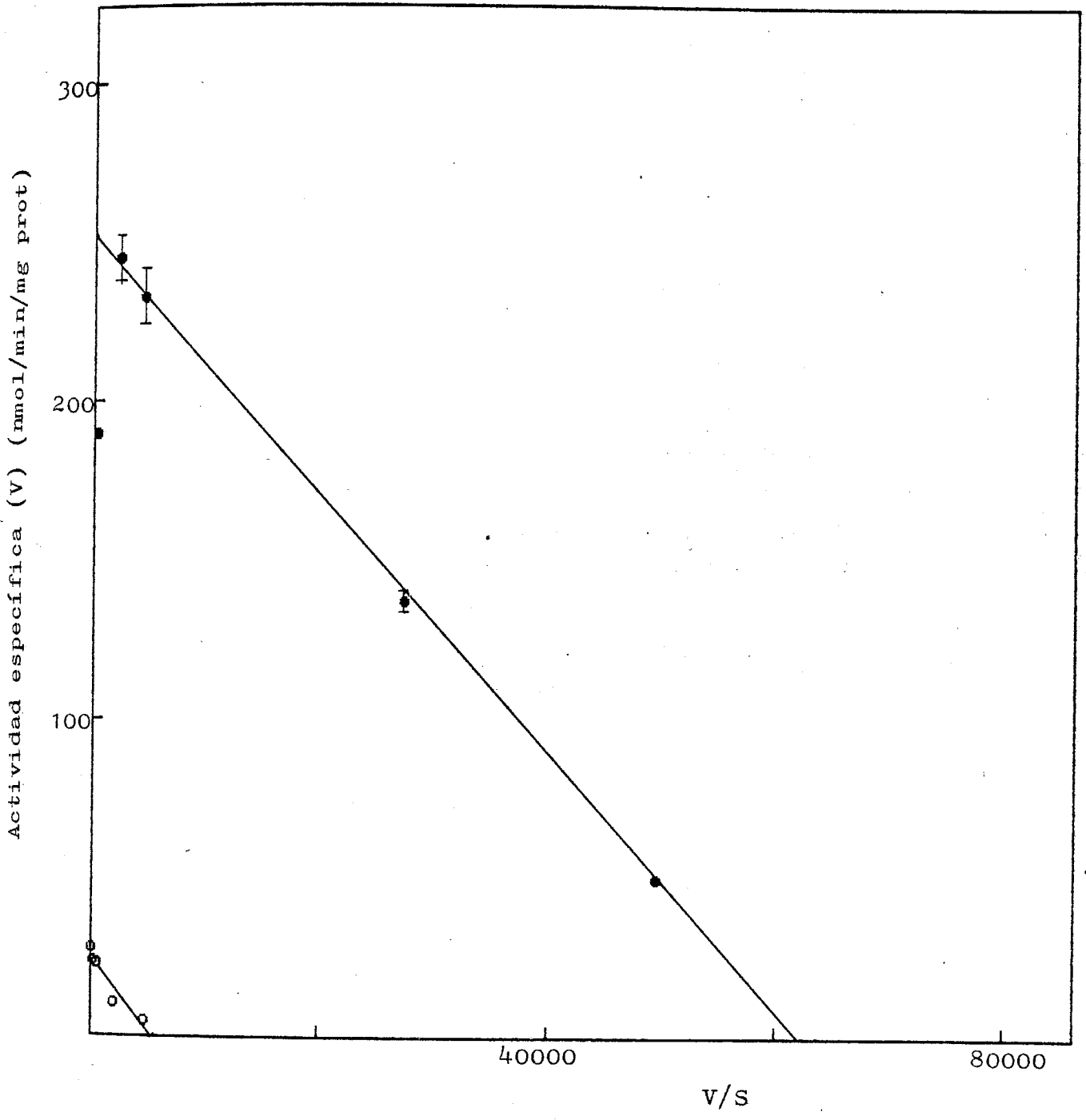
=====

Cuadro nº 31.- ACTIVIDAD ESPECIFICA DEL ENZIMA CITRATO SINTASA (E. C. 4.1.3.7) EN FORMAS EPIMASTIGOTAS Y METACICLICAS DE Trypanosoma cruzi, CUANDO LA CONCENTRACION DE ACETIL-COENZIMA A ES DE 0,3 mM.

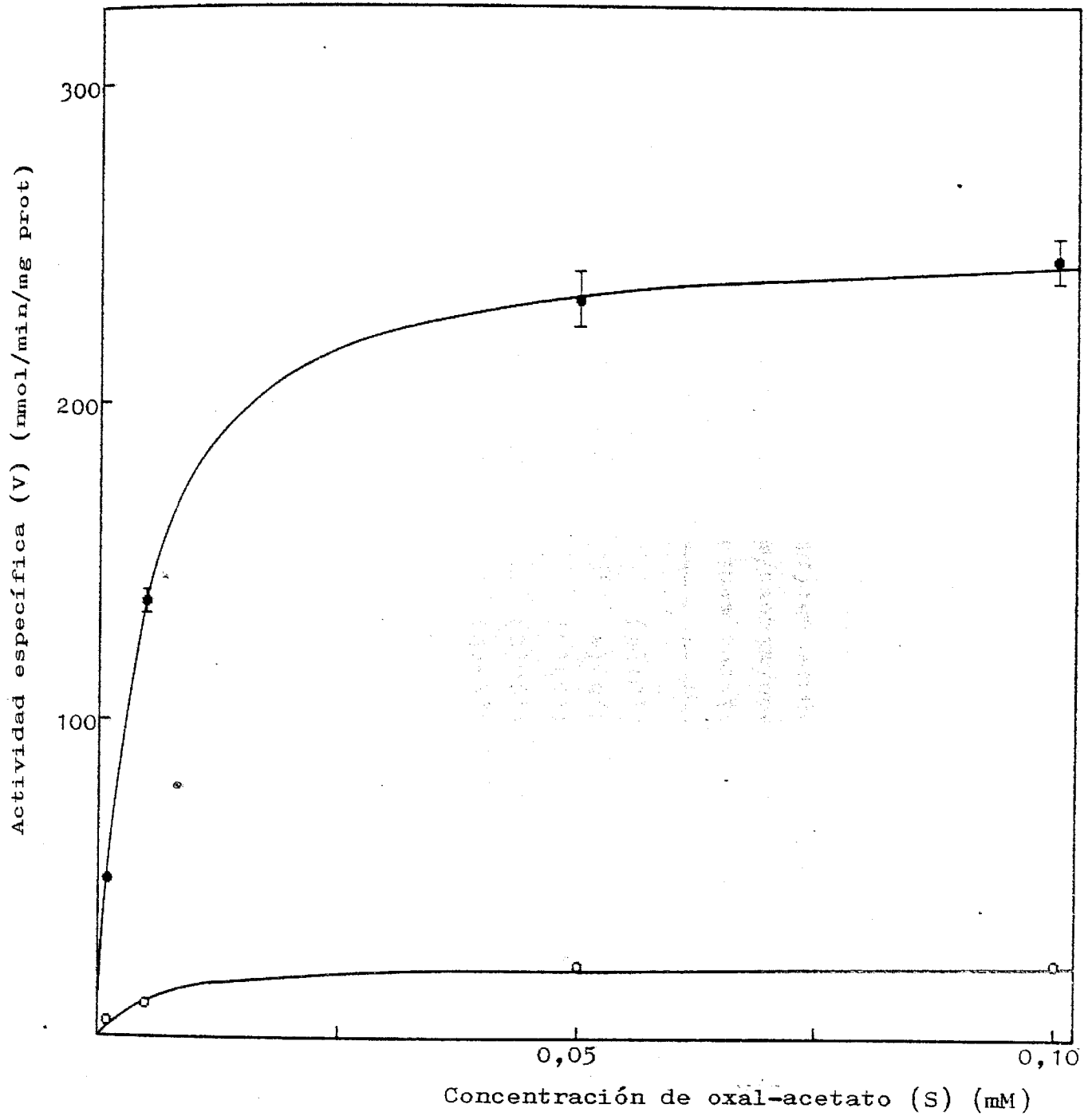
Concentración de oxalacetato (mM)	Actividad específica (a)	
	Epimastigotes	Metacíclicos
0,001	4,76±1,14(2)	49,51± 0,58(2)
0,005	10,08±0,17(2)	137,44± 6,64(3)
0,05	22,50±2,19(2)	232,63±17,18(2)
0,1	23,49±2,91(2)	244,61±13,80(2)
0,5	27,65±2,01(4)	189,97± 2,72(2)

(a) = Los resultados corresponden a los valores medios ± error estándar, expresados en nmoles de sustrato transformado /minuto/mg proteína. El número de de terminaciones duplicadas se indica entre paréntesis.

=====



GRAFICA N° 28.- Actividad citrato sintasa en las formas epimastigotas (o) y metacíclicas (●) de T.cruzi, cuando la concentración de acetyl-coenzima A es de 0,3 mM. Representación de Eadie-Hofstee. (S=Concentración de oxal-acetato, mM).



GRAFICA N° 29.- Desarrollo cinético de la actividad citrato sintasa en las formas epimastigotas (o) y metacíclicas (●) de T.cruzi (V versus S), (S=Concentración de oxal-acetato, mM), cuando la concentración de acetil-coenzima A es de 0,3 mM.

=====

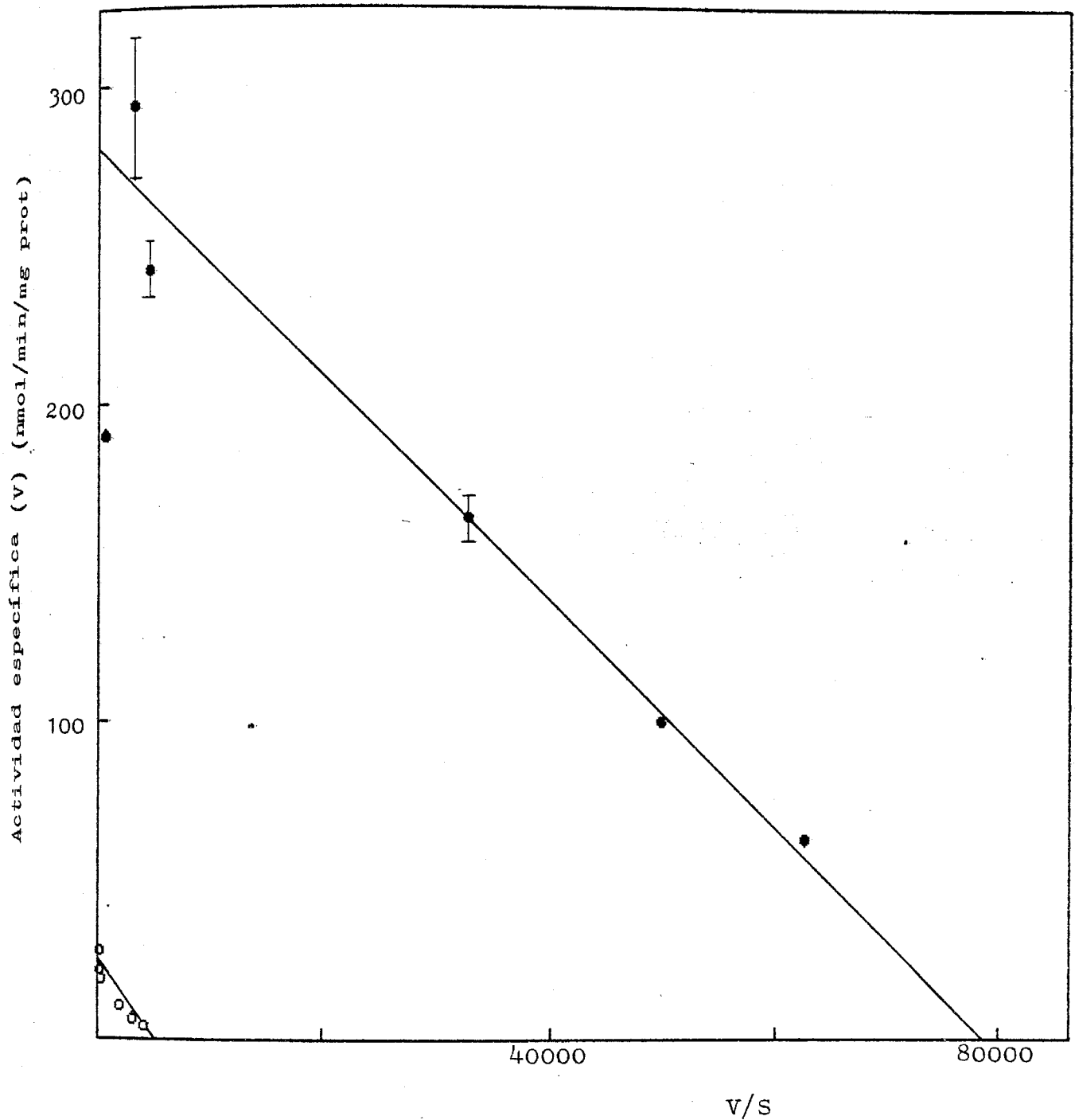
Cuadro nº 32.- ACTIVIDAD ESPECIFICA DEL ENZIMA CITRATO SINTASA (E. C. 4.1.3.7) EN FORMAS EPIMASTIGOTAS Y METACICLICAS DE Trypanosoma cruzi, CUANDO LA CONCENTRACION DE OXALACETATO ES DE 0,5 mM.

Concentración de acetil-CoA (mM)	Actividad específica (a)	
	Epimastigotes	Metacíclicos
0,001	4,27±0,47(3)	62,51± 0,98(2)
0,002	6,53±0,43(2)	99,66± 0,99(2)
0,005	10,48±1,20(2)	163,80±14,95(3)
0,05	18,71±1,54(3)	242,33±17,24(2)
0,1	21,57±3,63(4)	293,59±43,74(3)
0,3	27,65±2,01(4)	189,97± 2,72(2)

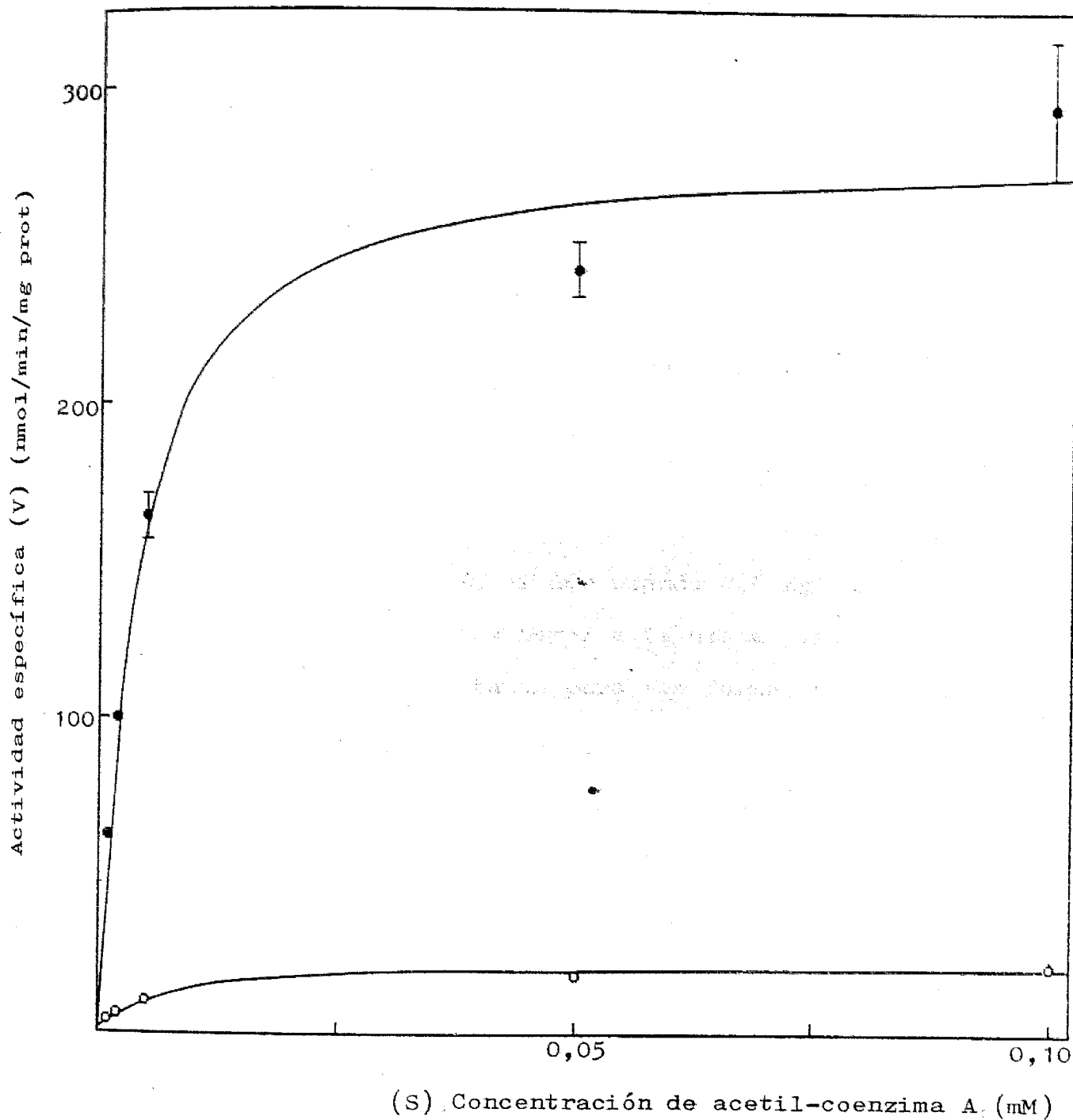
(a) = Los resultados corresponden a los valores medios ± error estándar, expresados en nmoles de sustrato transformado/minuto/mg proteína. El número de determinaciones duplicadas se indica entre paréntesis.

=====





GRAFICA N° 30.- Actividad citrato sintasa en las formas epiméricas (o) y metacíclicas (●) de T. cruzi, cuando la concentración de oxal-acetato es de 0,5 mM. Representación de Eadie-Hofstee. (S=Concentración de acetil-coenzima A, mM).



GRAFICA Nº 31.- Desarrollo cinético de la actividad citrato sintasa en las formas epimastigotas (o) y metacíclicas (●) de T.cruzi (V versus S), cuando la concentración de oxalacetato es de 0,5 mM.

4.7.7.- ISOCITRATO DESHIDROGENASA NADP (E. C. 1.1.1.42)  
Y NAD (E. C. 1.1.1.41) DEPENDIENTES.

Se ensaya la actividad específica del enzima isocitrato deshidrogenasa dependiente de NAD, así como la de la enzima isocitrato deshidrogenasa dependiente de NADP, como se indica en el apartado 3.13.7.

No se ha conseguido detectar actividad isocitrato deshidrogenasa NAD dependiente a concentraciones de sustrato de 2,0 mM, ni aún usando 0,6 mg de proteína/ml, cantidad doce veces mayor a la usada para el enzima dependiente de NADP, tanto para las formas epimastigotas como para las metacíclicas.

Sin embargo, sí se ha detectado una clara actividad isocitrato deshidrogenasa NADP dependiente. Los valores de ésta frente a la concentración de sustrato vienen detallados en el cuadro nº 33 y en la gráfica nº 32, observándose una cinética de tipo hiperbólico, tanto para los epimastigotes como para los metacíclicos.

Para calcular los valores de  $V_{m\acute{a}x}$  y de  $K_m$  utilizamos la ecuación de Eadie-Hofstee, empleando para ello los valores medios de la actividad específica halla

dos a las concentraciones de sustrato probadas, determinándose las rectas de regresión por el método de los mínimos cuadrados, obteniéndose las siguientes ecuaciones:

Para epimastigotes:  $y = - 0,031x + 102,20$  (R= 0,97)

Para metacíclicos:  $y = - 0,016x + 204,31$  (R= 0,95)

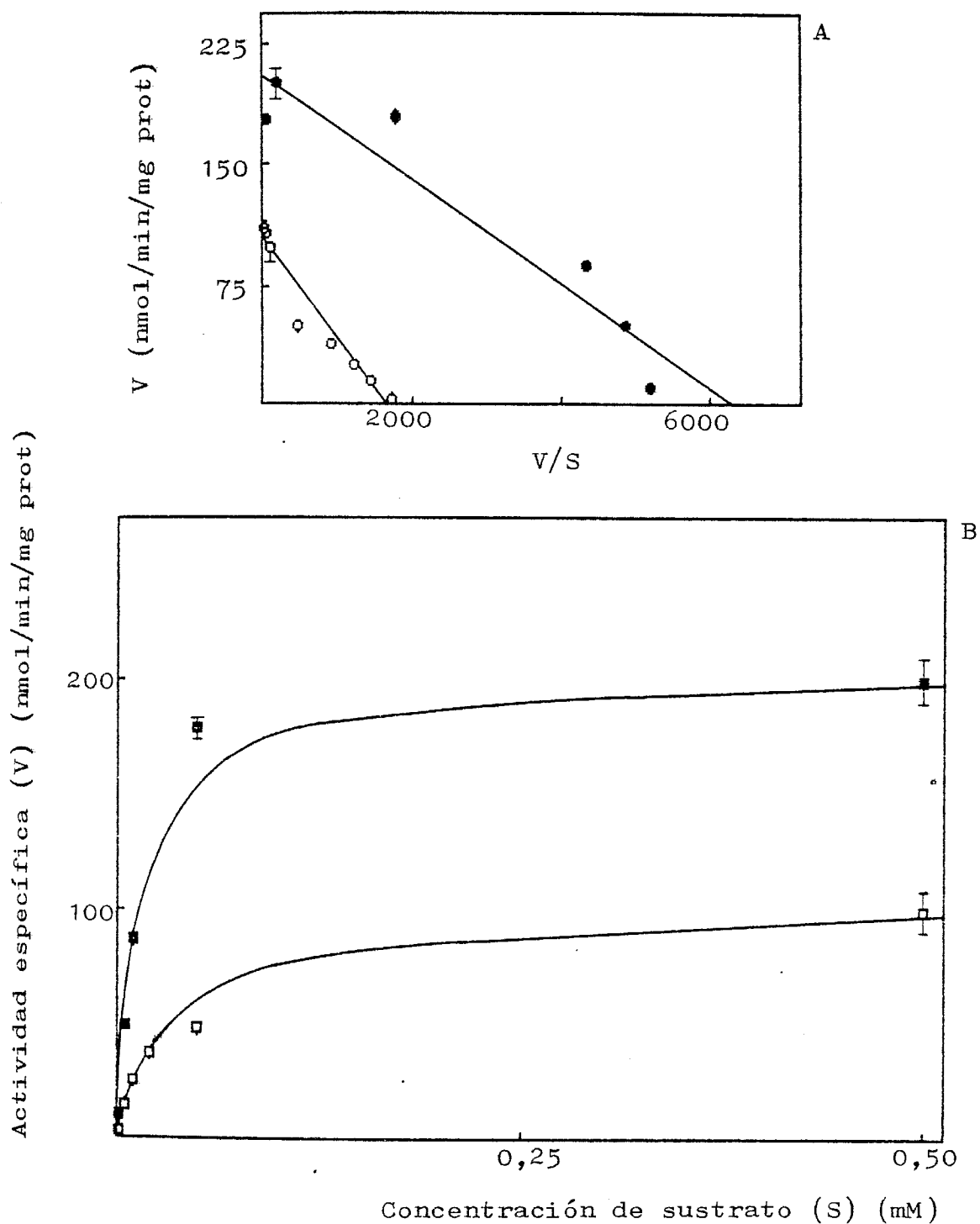
siendo el valor de Km de 31  $\mu\text{M}$  para los epimastigotes y de 16  $\mu\text{M}$  para los metacíclicos, mientras que la Vmáx es de 102,20 y 204,31 nmoles de sustrato transformado/minuto/mg de proteína de epimastigotes y metacíclicos, respectivamente.

=====  
 Cuadro nº 33.- ACTIVIDAD ESPECIFICA DEL ENZIMA ISOCITRATO DESHIDROGENASA NADP-DE-  
 PENDIENTE (E. C. 1.1.1.42) EN FORMAS EPIMASTIGOTAS Y METACICLICAS DE  
Trypanosoma cruzi.  
 =====

Concentración de sustrato (mM)	Actividad específica (a)	
	Epimastigotes	Metacíclicos
0,001	3,44± 0,43(3)	10,39± 2,04(4)
0,005	14,35± 2,53(3)	48,55± 3,11(2)
0,01	24,68± 3,30(3)	86,76± 6,30(2)
0,02	36,91± 1,82(2)	No determinado
0,05	47,96± 2,14(3)	178,69± 9,19(3)
0,5	98,85±17,58(2)	199,40±18,76(3)
1,0	107,51±13,53(2)	No determinado
2,0	110,31± 8,45(2)	177,14± 2,85(3)

(a) = Los resultados corresponden a los valores medios ± error estándar, expresados en nmoles de sustrato transformado/minuto/mg proteína. El número de determinaciones duplicadas se indica entre paréntesis.

=====



GRAFICA Nº 32.- Actividad isocitrato deshidrogenasa NADP-dependiente en las formas epimastigotas (○, □) y metacíclicas (●, ■) de T. cruzi. A: Representación de Eadie-Hofstee. B: Desarrollo cinético de la actividad enzimática (V versus S).

#### 4.7.8.- SUCCINATO DESHIDROGENASA (E. C. 1.3.99.1)

La actividad específica del enzima succinato deshidrogenasa se determina por el método descrito en el apartado 3.13.8.

Los resultados experimentales de la actividad específica vienen expresados de dos formas distintas: por mg de proteína y por mg de peso húmedo, con lo que podemos comprobar la relación proteína/peso húmedo en ambas formas de Trypanosoma cruzi (cuadros nº 34 y 35 y gráficas nº 33 y 34).

Los valores de  $K_m$  y  $V_{m\acute{a}x}$  son calculados en base a la ecuación de Eadie-Hofstee, empleando los valores medios de actividad encontrados a las concentraciones de sustrato ensayadas (excepto a 0,05 y 0,1 mM, en ambas formas), determinándose las rectas de regresión por el método de los mínimos cuadrados, obteniéndose las siguientes ecuaciones:

A) Por mg de peso húmedo.

- Para epimastigotes:  $y = - 0,40x + 0,85$  ( $R = 0,86$ )

de donde  $K_m = 0,40$  mM y  $V_{m\acute{a}x} = 0,85$  nmoles de sustrato transformado/minuto/mg de peso húmedo.

- Para metacíclicos:  $y = - 0,61x + 1,18$  (R= 0,88)

de donde  $K_m = 0,61$  mM y  $V_{máx} = 1,18$  nmoles de sustrato transformado/minuto/mg de peso húmedo.

B) Por mg de proteína.

- Para epimastigotes:  $y = - 0,41x + 8,07$  (R= 0,85)

de donde  $K_m = 0,41$  mM y  $V_{máx} = 8,07$  nmoles de sustrato transformado/minuto/mg de proteína.

- Para metacíclicos:  $y = - 0,67x + 38,34$  (R= 0,91)

de donde  $K_m = 0,67$  mM y  $V_{máx} = 38,34$  nmoles de sustrato convertido/minuto/mg de proteína.

Cuando se empleó Tritón X-100 para disolver las proteínas de membranas, la actividad succinato deshidrogenasa detectada fue prácticamente nula.



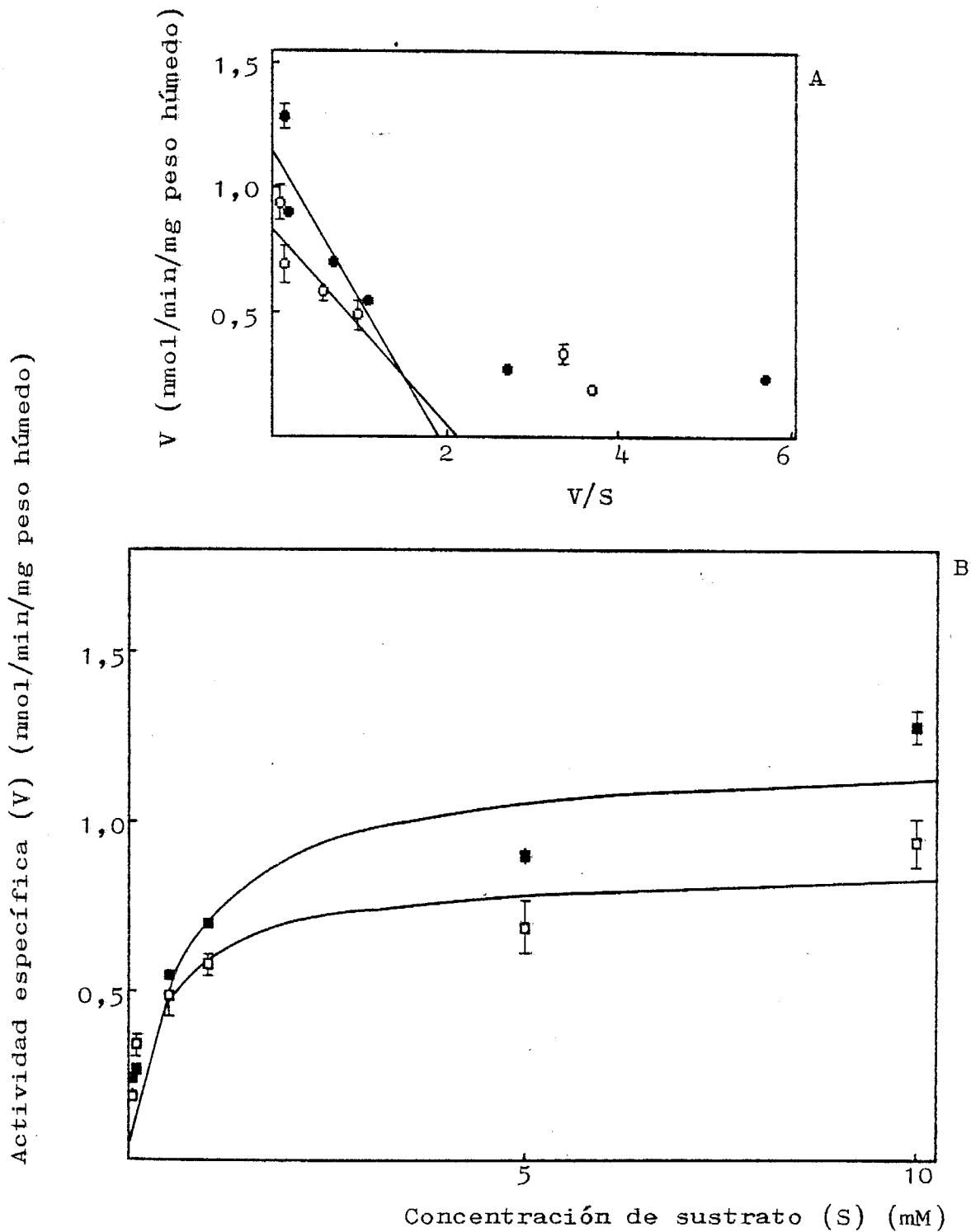
=====

Cuadro nº 34.- ACTIVIDAD ESPECIFICA DEL ENZIMA SUCCINATO DESHIDROGENASA (E. C. 1. 3.99.1) EN FORMAS EPIMASTIGOTAS Y METACICLICAS DE Trypanosoma cruzi.

<u>Concentración de sustrato (mM)</u>	<u>Actividad específica (a)</u>	
	<u>Epimastigotes</u>	<u>Metacíclicos</u>
0,05	0,19±0,02(4)	0,24±0,02(2)
0,1	0,34±0,06(4)	0,27±0,01(2)
0,5	0,49±0,12(3)	0,55±0,01(2)
1,0	0,58±0,06(3)	0,70±0,02(2)
5,0	0,69±0,15(3)	0,90±0,04(2)
10,0	0,94±0,14(3)	1,28±0,09(2)

(a) = Los resultados corresponden a los valores medios ± error estándar, expresados en nmoles de sustrato transformado/min/mg peso húmedo. El número de determinaciones duplicadas se indican entre paréntesis.

=====



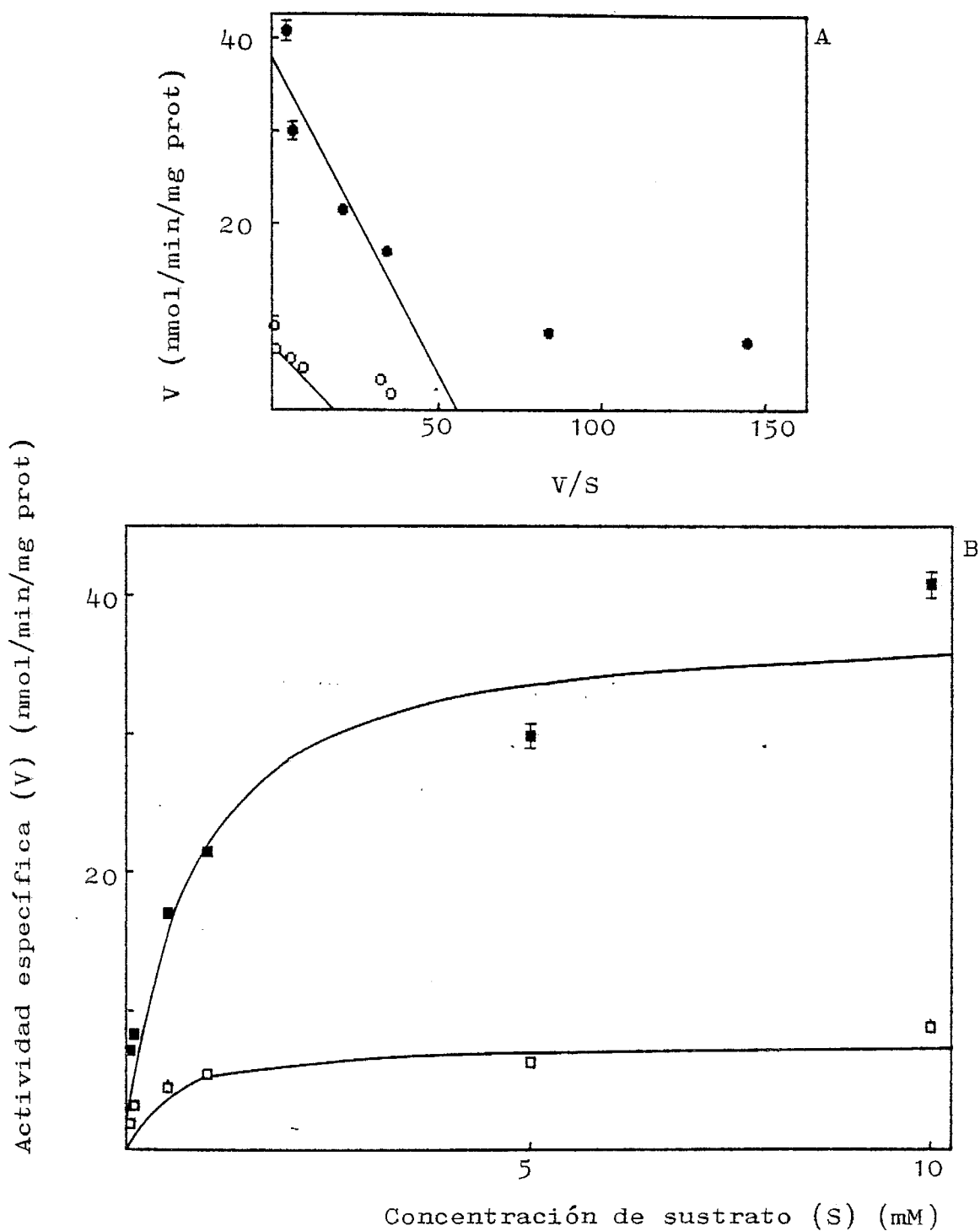
GRAFICA Nº 33.- Actividad succinato deshidrogenasa de las formas epimastigotas (○, □) y metacíclicas (●, ■) de *T. cruzi*. A: Representación de Eadie-Hofstee. B: Desarrollo cinético de la actividad enzimática (V versus S).

=====  
 Cuadro nº 35.- ACTIVIDAD ESPECIFICA DEL ENZIMA SUCCINATO DESHIDROGENASA (E. C. 1, 3.99.1) EN FORMAS EPIMASTIGOTAS Y METACICLICAS DE Trypanosoma cruzi.  
 =====

<u>Concentración de sustrato (mM)</u>	<u>Actividad específica (a)</u>	
	<u>Epimastigotes</u>	<u>Metacíclicos</u>
0,05	1,79±0,12(4)	7,22±0,44(2)
0,1	3,22±0,55(4)	8,35±0,18(2)
0,5	4,55±0,81(3)	17,05±0,08(3)
1,0	5,55±0,32(3)	21,49±0,36(2)
5,0	6,38±0,56(3)	29,88±1,63(4)
10,0	8,91±0,63(3)	40,76±1,96(3)

(a) = los resultados corresponden a los valores medios ± error estándar, expresados en nmoles de sustrato transformado/minuto/mg proteína. El número de determinaciones se indica entre paréntesis.

=====



GRAFICA N° 34.- Actividad succinato deshidrogenasa en las formas epimastigotas (o,□) y metacíclicas (●,■) de *T.cruzi*. A: Representación de Eadie-Hofstee. B: Desarrollo cinético de la actividad enzimática (V versus S).

5. - DISCUSSION

### 5.1.- METACICLOGENESIS DE Trypanosoma cruzi.

El hospedador invertebrado de Trypanosoma cruzi es un insecto redúvido de los géneros Triatoma, Rhodnius, Panstrongylus, ... En el recto del insecto tiene lugar la diferenciación de las formas epimastigotas (DIAS, 1934) o esferomastigotas (BRACK, 1968) a metacíclicas. Las glándulas rectales parecen ser la región preferida para su colonización, por T. cruzi, en el intestino de Triatoma infestans, T. dimidiata y Dipetalogaster maximus (ZELEDON y col., 1984; BOKER y SCHAUB, 1984).

Dada la estrecha relación entre el sistema excretor y el saco rectal, no hay duda que T. cruzi está influido por las secreciones y excreciones de estos órganos, los cuales constituyen su biotopo y su nicho ecológico (ZELEDON y col., 1977).

Es en la mitad posterior del intestino medio donde la absorción de carbohidratos tiene lugar en numerosos insectos. Cuando estos azúcares no se han absorbido completamente en el intestino medio, la función se realiza en la porción posterior. Esta interviene fundamentalmente en las funciones de digestión y absorción y

desempeña un papel especialmente importante en la formación de las heces y en la reabsorción del agua. Los puntos más activos en la absorción del agua son grupos de células epiteliales altas, localizadas en el recto y denominadas almohadillas rectales (MEGLITSCH, 1978), por lo que las heces tendrán pocos carbohidratos y poca agua, luego éstas tendrán una presión osmótica alta.

El material excretado por Rhodnius puede clasificarse, en opinión de WIGGLESWORTH (1931b), en tres fracciones. En todas ellas puede encontrarse T. cruzi:

- 1) Orina: fluido claro, copioso, coloreado, que se excreta poco después de la comida.
- 2) Fracción amarilla de la excreta: Masa seca, como un polvo.
- 3) Fracción negra de la excreta: masa negra que representa el residuo de la comida previa.

Las fracciones amarilla y negra tienen la misma composición en aminoácidos y sólo difieren en que la fracción negra está contaminada por hematina, lo que enmascara el color amarillo de los pigmentos excretados (HARRINGTON, 1961a y b).

En la orina se excreta ácido cisteico, cistina y sales inorgánicas. La excreta posterior (fracción amarilla y negra) contiene siete aminoácidos: Leu, Gly, Val, Ala, Phe, His y Taurina, junto con histamina y los pigmentos amarillos. Es digno de notar la alta concentración de histidina, no sólo en la excreta, sino también en la hemolinfa de Rhodnius prolixus (HARINGTON, 1961a y b) lo que coincide con lo encontrado en otros insectos. Otras sustancias de la excreta de Rhodnius son ácido úrico (WIGGLESWORTH, 1931b), urea y amonio, estos dos últimos también presentes en la excreta de Triatoma. El amonio no se encuentra en la orina y no es común en la excreta de animales terrestres.

Por otra parte, en este mismo insecto, se observa una secreción selectiva de  $K^+$  en el segmento superior del túbulo de Malpigio y una reabsorción del ión en el segmento inferior; el  $Na^+$ , junto con el agua, será reabsorbido en el recto (WIGGLESWORTH, 1959).

El medio de GRACE (1962) con el que trabajamos contiene todos los aminoácidos excretados, excepto la taurina, el cual es proporcionado así como la histamina, por el SBF con el que se suplementa el medio de cultivo



(TABLAS CIENTIFICAS, 1965). Es de notar que este medio tiene un elevado contenido de histidina (2,5 g/l).

Se ha trabajado en medios de elevada presión osmótica con diversos tripanosomátidos parásitos de insectos, observándose en general que no se afectan de forma importante las curvas de crecimiento de estos protozoos y que incluso el desarrollo se ve favorecido en algunas especies de Crithidia y Herpetomonas (TAVARES Da SILVA y ROITMAN, 1982).

En Herpetomonas samuelpessoai, parásito de reduvidos, no sólo se favorece el crecimiento sino que también se induce una transformación de formas promastigotas a formas paramastigotas y de éstas a opistomastigotas (ALMEIDA y SOUZA, 1978), diferenciación que también ocurre cuando en lugar de aumentar la presión osmótica, se adiciona 2-deoxi-D-glucosa (ANGLUSTER y col., 1977) o por incubación a 37°C en lugar de a 28°C (ROITMAN y col. 1976). Este aumento de temperatura también conduce a una transformación en Trypanosoma conorhini, parásito de mamíferos, (DEANE y KIRCHNER, 1963; DESOWITZ, 1963).

Sin embargo, Crithidia fasciculata parece tener un requerimiento osmótico o al menos de electrolitos

(quizás específicamente para ClNa) así como de un factor lipídico para el crecimiento a temperaturas superiores a las normales de cultivo, posiblemente, en opinión de los autores, para una eficiente reparación de membranas, como ocurre con otros microorganismos (ELLENBOGEN y col. 1972; GUTTMAN, 1963).

CROSS y col. (1975a) ensayan el cultivo de Trypanosoma cruzi en medios HX25M descrito para T. brucei, cepa S 42, sin obtener un crecimiento muy bueno, lo cual achacan a una presión osmótica excesiva del medio o a un pH no adecuado. Como nosotros hemos observado un buen crecimiento de T. cruzi en medios de presión osmótica elevada (cuadros nº 3, 5 y 7), no coincidimos con estos autores y consideramos que, simplemente, el medio no es adecuado por la ausencia de algún factor de crecimiento para T. cruzi (o bien que su concentración no sea la óptima).

Por otra parte, todos los microorganismos que durante su evolución se establezcan en el tracto digestivo de insectos como una fase fundamental de su ciclo de vida, deben tener mecanismos reguladores de la presión osmótica. Así, CLARK (1959) confirma la existencia en

T. cruzi de una vacuola contráctil, situada en la base del flagelo, que se encargaría de la osmorregulación del protozoo.

La amplia distribución entre flagelados de vida libre de un sistema de vacuola contráctil que descarga en la bolsa flagelar, sugiere que éste puede representar una exocitosis primitiva y función de recuperación osmótica, la cual se ha adaptado secundariamente a la secreción de sustancias con otras funciones en los flagelados parásitos que habitan medios osmóticamente más estables. Entre las sustancias excretadas se encuentran las glicoproteínas de superficie responsables de las variaciones antigénicas en T. brucei (VICKERMAN y PRESTON, 1976).

Los efectos de la presión osmótica y de la temperatura podían ser importantes de cara a la transformación de tripanosomas patógenos, donde el paso del hospedador invertebrado al vertebrado, es acompañado de cambios osmóticos y de temperatura (TAVARES Da SILVA y ROITMAN, 1982).

El medio Grace modificado por OSUNA y col. (1979) muestra unos rendimientos de metaciclo<sup>g</sup>énesis ele

vados, tal como ya se ha expresado en apartados anteriores.

Dado que la única modificación existente en dicho medio sobre el Grace comercial es la brusca bajada y subida de pH con ClH y NaOH (apartado 3.4.) y pensando que este cambio podría alterar alguno de los componentes del medio, preparamos sus diferentes compuestos como se indica en el apartado 3.3. Se pudo comprobar que el mejor rendimiento correspondía a cuando la alteración del pH se realizaba con los azúcares.

Del estudio con el cromatógrafo líquido de alta presión (apartado 3.3.1.) de las posibles modificaciones sufridas por los azúcares, se demostró que éstos no experimentaban variación y que las alteraciones del diagrama del cromatógrafo (fig. nº 1 ) se debían a la presencia de ClNa, formado en el tratamiento con ClH y NaOH de los azúcares (apartado 4.2.).

Por ello, decidimos realizar un estudio sobre el papel que el ClNa y/o la presión osmótica, u otros factores relacionados (fuerza iónica, concentración de  $\text{Na}^+$ , ...), juegan en el proceso de metaciclologénesis.

En la primera experiencia se realizó un estudio con concentraciones crecientes de ClNa (apartado 3.2.4.). Ello supone un incremento de la concentración de  $\text{Na}^+$  desde 25 meq/l, que lleva el control (G0), a 75 meq/l (G1), 125 meq/l (G2) y 175 meq/l (G3), medidas con un electrodo selectivo Beckman. Este aumento de la concentración de ClNa genera, igualmente, un incremento de la presión osmótica desde 375 mOsm, que tiene el control (G0), a 475 (G1), 575 (G2) y 675 (G3) mOsmoles, medidos en un osmómetro automático (Precision Systems Inc., modelo Osmette S).

Los resultados obtenidos sobre el crecimiento (cuadro y gráfica nº 3) no muestran diferencias significativas a nivel de crecimiento máximo, con respecto al control. Sin embargo, a nivel de transformación máxima (cuadro nº 4) sí se observan diferencias significativas, con respecto al control, en el medio G1 ( $P < 0,03$ ) y en el medio G2 ( $P < 0,004$ ). En el medio G3 las diferencias no son significativas, indicando que una excesiva concentración de ClNa, de  $\text{Na}^+$  y/o presión osmótica (675 mOsm) bloquean la mejora de la diferenciación producida en G1 y G2. No parece que estos factores influyan sobre el crecimiento.

Con el fin de comprobar si la presión osmótica era la causante de este aumento de la metaciclologénesis, se realizó un estudio con diversos medios de cultivo en los que se producía la misma presión osmótica que en G1, G2 y G3, con distintas concentraciones de sorbitol, medios G6 (475 mOsm), G7 (575 mOsm) y G8 (675 mOsm) (apartado 3.2.4.).

Con respecto al crecimiento se puede observar, tanto en las curvas como en los valores de crecimiento máximo, una disminución del mismo a medida que aumenta la concentración de sorbitol en el medio de cultivo, que en ningún caso llega a ser significativa (cuadro y gráfica nº 7).

En cuanto a la transformación, no se observan diferencias apreciables en las curvas, pero a nivel de transformación máxima, se muestran menores diferencias en G7 (34,3%) y en G8 (29,5%), aunque no son significativamente diferentes al control (36,8%).

De todos los resultados anteriormente expuestos se deduce que la presión osmótica parece que no es el factor que provoca el incremento de la transformación máxima observada en G1 y G2, a no ser que el aumento de la

viscosidad del medio, que se produce al aumentar la concentración de sorbitol en el mismo, bloqueara el estímulo de la transformación generado por la presión osmótica.

Por ello, se decidió trabajar con medios de presión osmótica de 475 mOsm, como en el caso de G1, producida por ClK (medio G<sup>4</sup>), sulfato magnésico (G5) y sacarosa (G9), con el fin de que una concentración elevada de estos productos no tuviera un efecto negativo sobre la metaciclogénesis.

Al observar los resultados obtenidos de crecimiento del parásito en estos medios (cuadro y gráfica n° 5) se deduce que estas curvas son similares, con un ligero aumento cuando el medio era adicionado con sulfato magnésico, sin embargo no se obtuvieron diferencias significativas a nivel de crecimiento máximo.

En cuanto a la transformación obtenida con estos medios (cuadro y gráfica n° 6), sólo se observa un ligero retraso en la curva del medio adicionado con sacarosa, pero a nivel de transformación máxima, los resultados son muy similares, excepto en el medio con ClK, en el que fue mayor, aunque estadísticamente no significativo.

Por todo ello parece que se puede excluir la presión osmótica como factor principal desencadenante del incremento de la diferenciación de Trypanosoma cruzi en los medios G1 y G2.

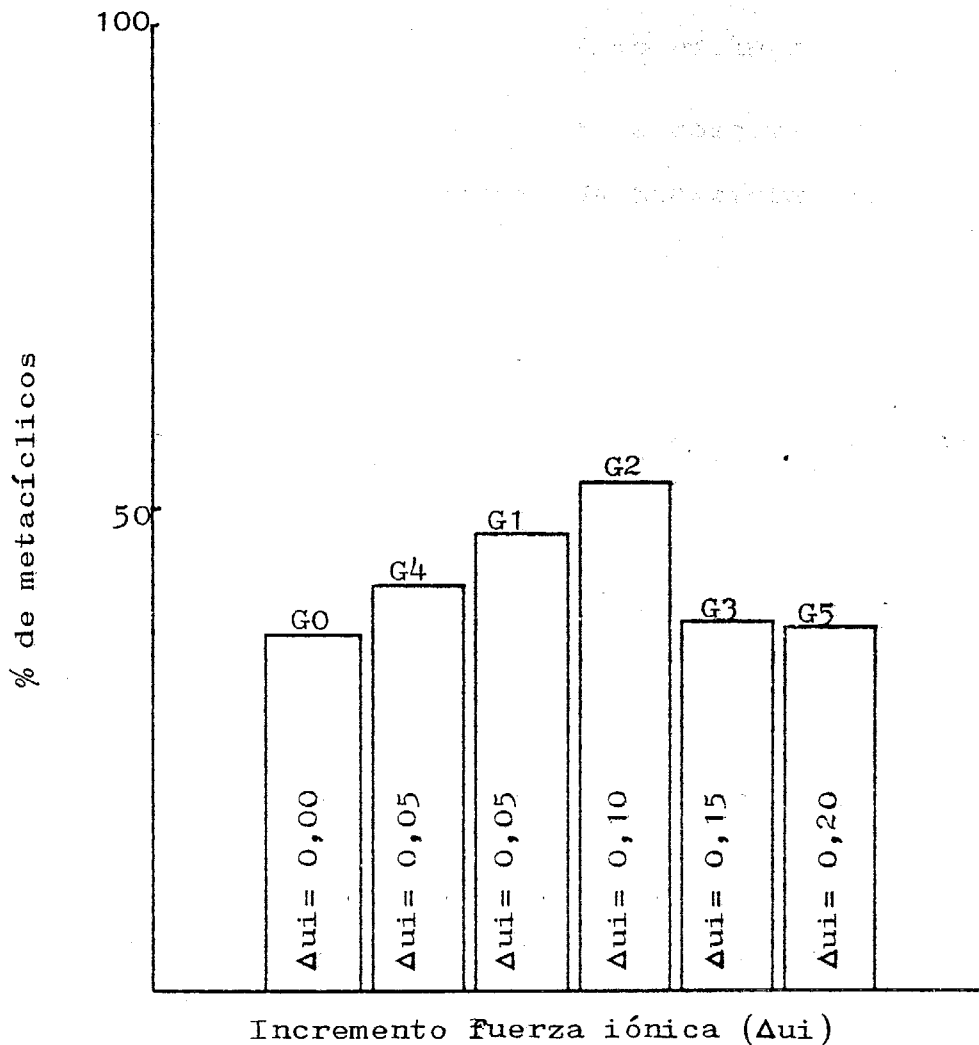
Otro posible hecho que puede haber influido en el incremento de la metaciclo<sup>g</sup>énesis de estos medios, es el incremento de la fuerza iónica originado por los electrolitos añadidos.

Para analizar este factor, comparamos los resultados obtenidos con los diversos electrolitos siguiendo la escala de fuerza iónica producida por los mismos. De la observación de la gráfica nº 35 se deduce un aumento de la transformación cuando el incremento de la fuerza iónica no supera 0,10, mientras que los valores de 0,15 y 0,20 rebajan los valores de diferenciación a los obtenidos con el control.

De ello parece deducirse que, o bien la fuerza iónica no tiene ningún papel en el crecimiento y en la transformación, o bien se requiere una fuerza iónica adecuada para un aumento de la diferenciación.

Otro posible factor del aumento de la metaciclo<sup>g</sup>énesis en G1 y G2, podría ser la relación entre las con





GRAFICA. N° 35.- Influencia del incremento de la fuerza iónica sobre el porcentaje de metaciclogénesis máximo de T. cruzi en los medios de cultivo Grace modificados del grupo B.

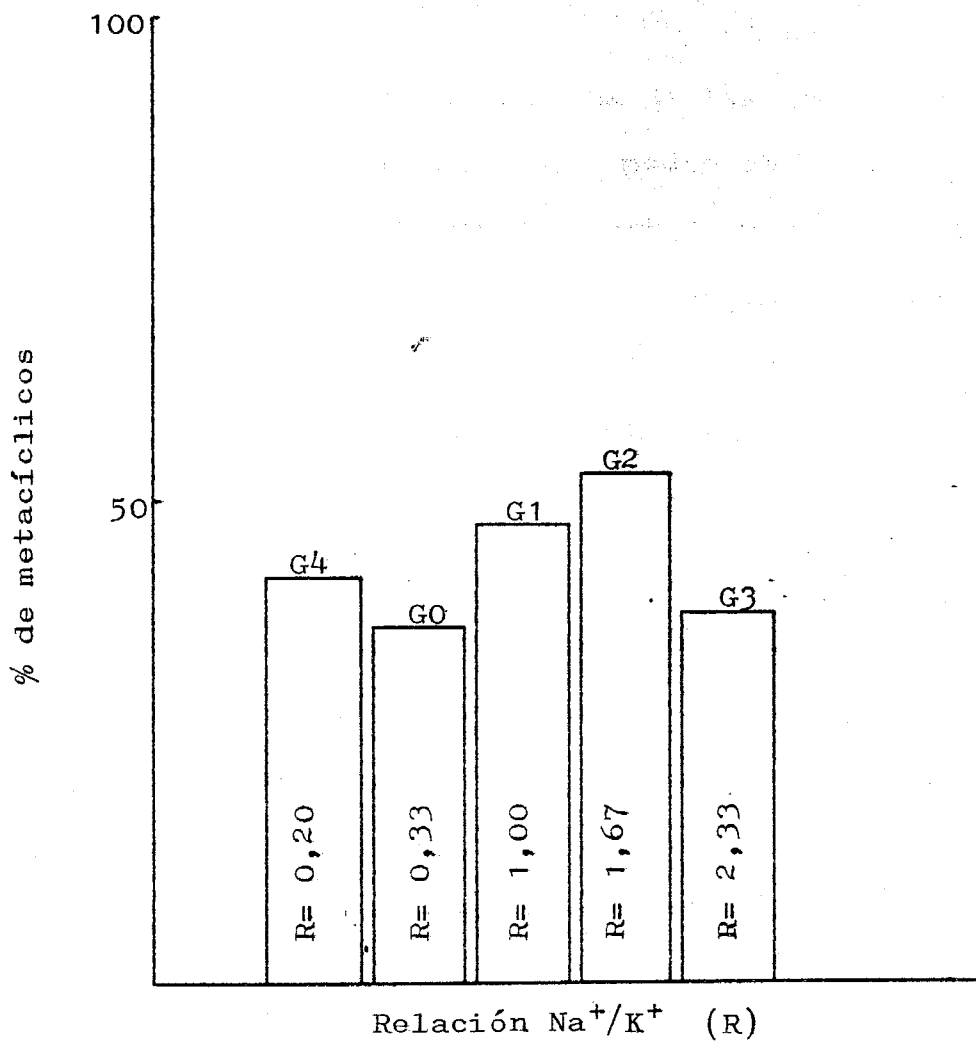
centraciones de los iones  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$  existente en los medios de cultivo ensayados. (la concentración de  $\text{K}^+$  ha sido medida en un electrodo selectivo Beckman).

En la gráfica nº 36 no se observa ninguna relación entre los valores máximos de transformación y los de la relación  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ , siendo el rango de crecimiento máximo similar en todos los casos.

Por último, pensamos que la concentración de  $\text{Na}^+$  a unos niveles adecuados podría ser el factor que incrementara la transformación, pero que los niveles excesivos del mismo (175 meq/l) bloqueen este proceso.

El medio con el que mejor transformación se obtiene (G2) tiene una concentración de  $\text{Na}^+$  de 125 meq/l, próxima a la concentración que existe en la orina de Dipetalogaster maximus, un vector de Trypanosoma cruzi. (ZELEDON y col., 1977).

Por todo ello, pensamos que la inducción para la transformación de formas epimastigotas a formas metacíclicas de T. cruzi, es multifactorial, bajo nuestras condiciones experimentales. Parece que los niveles adecuados de  $\text{Na}^+$  juegan un papel importante en la misma, aunque quizás la presión osmótica o la fuerza iónica idó



GRAFICA Nº 36.- Influencia de la relación  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  sobre el porcentaje de metaciclogénesis máximo de T.cruzi en los medios de cultivo Grace modificados del grupo B.

neas, inducidas por el ClNa añadido, no serían factores descartables, siendo quizás factores asociados en el proceso de metaciclogénesis.

Es de notar que ninguna de las modificaciones, realizadas hasta el momento, del medio de cultivo alteró la curva de crecimiento de T. cruzi de una manera significativa, por lo que la posibilidad de un crecimiento excesivo del protozoo queda descartada para explicar el aumento de la metaciclogénesis obtenido.

La alta concentración de ácido úrico encontrada en la orina de Rhodnius prolixus, que supone del 64 al 84% de la orina seca y del que el 83-89,5% está en forma de ácido libre (WIGGLESWORTH, 1931a), ha sugerido a algunos autores que esta sustancia o sus sales podría jugar un papel importante en la diferenciación. Así, ZELEDON y ALVARENGA (1976) adicionan a su medio de cultivo urato sódico, mientras que JIMENEZ ORTIZ (1981) adiciona ácido úrico. En ambos casos los autores no observan ningún estímulo de la transformación, por lo que deben existir otros factores en la orina del insecto vector que favorezcan dicho proceso. STEINERT (1958) demostró, "in vitro", que el paso de epimastigotes a tripomas

tigotes sanguíneos podía ser inducido por la adición de urea al medio de cultivo de Trypanosoma mega, parásito de sapos, en la fase estacionaria de crecimiento.

Diversos autores, pensando en la posibilidad de que existan factores intrínsecos del vector, añaden a los medios de cultivo hemolinfa o extractos totales o de órganos aislados del redúvido o de otros insectos. De esta manera, WOOD y PIPKIN (1969), usan un sistema de cultivo de células del insecto Antheraea eucalypti adicionado con hemolinfa de un lepidóptero, Philosamia cynthia, a diversas concentraciones, junto a concentraciones variables de SBFI, llegando a obtener un 90% de metatrimastigotes con 1% de hemolinfa y 10% de SBFI. WOOD y SOUSA (1976) remplazan la hemolinfa de P. cynthia por extracto de Rhodnius prolixus, con resultados similares para concentraciones de extracto de 0,25%.

Estos autores suponen que en la hemolinfa de los insectos existen factores que pueden afectar al parásito cuando se encuentra en el intestino del vector. Para ello se basan en un trabajo de CLEVELAND (1959) en el que se demuestra que la ecdisona, hormona de la muda de los insectos, induce la reproducción sexual de los pro-

tozoos flagelados que existen como endosimbiontes en el intestino de Cryptocercus punctulatus (cucaracha comedora de madera).

Cuando se prepararon extractos de diversos hemípteros se encontró que, aunque todos no tuvieron la misma capacidad estimuladora de la diferenciación, todos poseyeron algún factor favorecedor de la misma (CHIARI y CARNEIRO, 1978a). Los autores concluyen que este factor común a Hemiptera, puede estar presente en otros órdenes de insectos, ya que la hemolinfa del lepidóptero P. cynthia también estimula la transformación.

Recientemente, De ISOLA y col. (1981) adicionan al medio de cultivo extracto de diversos órganos de Triatoma infestans, observando un incremento de la metaciclogénesis en el caso de los extractos de intestino y de estómago, pero sólo si la chinche estaba recién alimentada y no en ayunas. Sugieren la posibilidad de que la sangre procedente de la comida del redúvido esté incluida en el proceso, bien directamente bien por estimulación de la producción y/o secreción de componentes específicos.

Sin embargo, ALVARENGA y BRENER (1978) demues

tran que, al menos "in vivo", el ciclo de vida del parásito en el vector puede ser desarrollado incluso en chinches alimentadas con solución salina que lleva en suspensión tripomastigotes, es decir, sin sangre. LANAR (1979) propone que algún o algunos factores secretados por una línea celular embrionaria de T. infestans (TI-32) son responsables de la diferenciación de las formas estafilomastigotas a metacíclicas. Por todo ello, la fuente de alimento de los triatomas no parece ser crítica.

De diversas regiones del tracto intestinal del vector, han sido aisladas varias lectinas (PEREIRA y col., 1980 y PEREIRA y col., 1981) capaces de unirse a Trypanosoma cruzi. Se ha propuesto que la interacción de estas lectinas con las superficies de las membranas de los parásitos, regula la morfogénesis de este protozoo en el intestino del redúvido.

SHER y SNARY (1982) describen la inhibición de la diferenciación de epimastigotes a metacíclicos in vitro, por medio de un anticuerpo monoclonal específico para una glicoproteína de superficie de T. cruzi de peso molecular 72000 y proponen que esta molécula puede ser

un receptor que controla la diferenciación del parásito en la chinche.

COX (1982), comentando los resultados de SHER y SNARY (1982), sugiere que en el intestino del insecto vector existe una sustancia o sustancias que reaccionan con la glicoproteína de Pm 72000 de la superficie del epimastigote, inhibiendo así la transformación a metatripomastigote. Esta inhibición puede servir a dos propósitos: primero, para acumular epimastigotes en el intestino medio hasta que haya una proporción relativamente grande que pueda transformarse a metacíclicos, asegurando así la infección del hospedador vertebrado y, segundo, para retener un número de epimastigotes no transformados para posteriores diferenciaciones e infecciones. Los parásitos necesitan ser retenidos en el intestino medio, ya que las condiciones nutricionales son más favorables que en el intestino posterior.

Recientemente, De ISOLA y col. (1984) llegan a la conclusión de que en el intestino del redúvido existe un factor responsable de la transformación. Dicho factor cuando es adsorbido por formas epimastigotas de T. cruzi o promastigotas de Leishmania mexicana, pierde su



actividad. De manera similar ocurre cuando se adsorbe con eritrocitos de oveja. Esto implica que dicho factor debe ligarse a las membranas del parásito o de las células de oveja, lo que sugiere un mecanismo parecido al de las lectinas.

SHER y col. (1983), utilizando cámaras de di fusión implantadas subcutáneamente en ratones en las que se colocan epimastigotes, consiguen una elevada transformación a tripomastigotes en 24 horas, basándose en la hipótesis de que la exposición de una etapa de invertebrado (epimastigote) al hospedador vertebrado podría inducir al parásito a diferenciarse, como una adaptación a su nuevo medio. Cuando los parásitos se sacaron de las cámaras tras 7 horas y se colocaron en un medio de cultivo, la transformación tuvo lugar igualmente, por lo que los autores piensan que es posi ble disociar operacionalmente los hechos que disparan la transformación morfológica de epimastigote a tripomastigote del proceso de diferenciación en sí mismo. Suponen la existencia de factores del hospedador verte brado que programan o desencadenan la transformación a tripomastigote.

La influencia del suero en la metaciclologénesis de T. cruzi, también ha sido investigada, pero mientras hay unanimidad de su necesidad para un crecimiento adecuado, en cambio su actuación en la transformación es controvertida.

WOOD y PIPKIN (1969), LOPETEGUI y SOSA-MIATE LLO (1982) y UCROS y col. (1983) coinciden en que la presencia del suero en concentraciones adecuadas (6-10%) es fundamental para este proceso, es más, O'DALY (1976) observó que determinadas fracciones y proteínas del suero son esenciales para el mismo. Sin embargo, SULLIVAN (1982) consiguió similares porcentajes de metaciclologénesis en medios sin suero y con distintas concentraciones de suero (entre 1 y 10%).

Quizás las diferentes cepas de T. cruzi usadas, así como los distintos medios empleados, son la explicación de estos resultados discordantes.

O'DALY (1976) sugiere que la transformación es inducida por fracciones proteicas de diferentes movilizadas electroforéticas obtenidas del SBF. El principal factor estimulante pudo ser un péptido de bajo peso molecular, similar al que actúa de estímulo a la división (O'

DALY, comunicación personal a ZELEDON y col., 1977). Hay una posibilidad de que tales sustancias estén presentes en la orina de la excreta de redúvidos, ya que HARING - TON (1961b) indicó que al menos dos de los pigmentos amarillos encontrados en las heces eran péptidos.

Muchos autores coinciden en que un factor indispensable para la transformación es el agotamiento de determinadas sustancias en el medio y que cuanto más in completo sea éste, soporta una menor multiplicación de los flagelados, aunque se obtienen mayores porcentajes de diferenciación, esto siempre se produce al finalizar la fase exponencial de crecimiento (CAMARGO, 1964; CHIA RI y CARNEIRO, 1978b; LOPETEGUI y SOSA-MIATELLO, 1982; CONTRERAS y col., 1985).

CASTELLANI y col. (1967) observan que al añadir a la mezcla básica del medio LIT, infusión de hígado de buey, el proceso de diferenciación desciende, aun que el número total de protozoos/ml aumenta notablemente. Igual le sucedió cuando la adición fue infusión de corazón de perro y el pH del cultivo era de 7,2. Pero cuando este cultivo se realizó a pH 6,7, continuó el buen crecimiento acompañado de un grado de diferencia -

ción alto. Otros factores, además del pH, que afectan a la metaciclogénesis, según estos autores, son la edad del cultivo, el tamaño del inóculo y la preincubación a ciertos niveles bajos de temperatura (21°C, 48 horas).

FERNANDES y col. (1969) consideran que el agotamiento de carbohidratos (sustrato) del medio de cultivo de este hemoflagelado, coincide con el término de la fase exponencial de crecimiento, y la acumulación de ácidos orgánicos (ácidos succínico y málico) conduce a valores mínimos de pH (5,6-6,0). Con el consumo de estos ácidos, el pH se eleva de nuevo y los parásitos se diferencian. Ellos encuentran, en experimentos no publicados, que los ácidos acético y pirúvico, añadidos a un medio libre de glucosa a pH inicial bajo (6,0 ó menor), lleva a una rápida transformación de formas epimastigotas a metacíclicas.

La inclusión del ciclo de los ácidos tricarbóxicos en la inducción de la diferenciación es, aparentemente, un hecho general, al menos en bacterias. BRUN y SCHONENBERGER (1981) estimulan la transformación de formas sanguíneas de T. brucei a formas procíclicas, in vitro, por adición de citrato y/o cis-aconitato al medio de cultivo.

Si se mantiene la concentración inicial de glucosa por adición diaria, se inhibe la diferenciación y el pH decrece hasta niveles tóxicos. Si el cultivo se realiza en condiciones de anaerobiosis a pH 6,7, se inhiben tanto el crecimiento como la transformación. La oxidación de la glucosa a través del ciclo de las pentosas es muy pronunciada y el ciclo de Krebs funciona a velocidad limitada (CACERES y FERNANDES, 1976).

Para estos autores, la oxidación de la glucosa no está relacionada con la diferenciación, pero ésta sí lo está con el consumo de los ácidos orgánicos succínico y málico. Suponen que la situación fisiológica en el final del intestino del vector puede ser muy similar a un cultivo con la glucosa agotada; el medio es pobre en nutrientes y en oxígeno, y el ciclo de Krebs, aparte de energía, puede reconvertir los ácidos orgánicos en aminoácidos (alanina, ácido aspártico y ácido glutámico, De BOISO y STOPPANI, 1973), permitiendo todo ello la metacilogénesis. De BOISO (1983) también considera que la acidificación del medio, aunque disminuye la velocidad de crecimiento, estimula la diferenciación a metacíclicos.

Sin embargo, LOPETEGUI y SOSA-MIATELLO (1982) consiguieron diferenciación sin que el pH bajara de 7,0 y UCROS y col. (1983) obtuvieron incluso mejor transformación a un pH inicial 9,0 que a un pH 5,5-6,0. LANAR (1979) llega a las mismas conclusiones que los anteriores: la metaciclologénesis es independiente del pH.

Hay poca información en la literatura concerniente al rango de pH existente en el intestino posterior de las chinches redúvidas. WIGGLESWORTH (1931b) estudió el pH de los túbulos de Malpigio de Rhodnius prolixus. Estos órganos son responsables de la excreción de ácido úrico en la porción posterior del intestino del insecto. WIGGLESWORTH encontró que era ligeramente ácido (pH 6,6) en su segmento inferior. El ácido úrico es, de hecho, un ácido débil ( $pK_1$  5,4). ZELEDON y col., (1977) informan que el pH de la orina de Dipetalogaster maximus es bastante alcalino (pH 8,5), excepto inmediatamente después de la ingesta de sangre, que baja a 7,5.

Otro factor importante a tener en cuenta y que diversos autores han hecho notar, es el frasco o recipiente de cultivo empleado, pues parece que la difusión de los gases puede ser importante para la metaci-

clogénesis, al menos in vitro, ya que se obtienen porcentajes muy diferentes de transformación según el tipo de frasco empleado (UCROS y col., 1983).

OSUNA y col. (1979) consiguieron una elevada transformación en medio Grace suplementado con 10% de S BFI, medio al que habían sometido previamente a una drástica bajada de pH hasta 1,5 con ClH y posterior ajuste a 5,8 con NaOH. Ellos sugieren la alteración, por acción del ácido o de la base usados, de uno o varios componentes del medio de cultivo y proceden a estudiar 3 vitaminas que, hipotéticamente, pudieron alterarse en dicho proceso. Estas vitaminas fueron tiamina, ácido fólico y pantotenato cálcico. De sus estudios sugieren que la ausencia de tiamina o los productos de su alteración influyen positivamente en la transformación y son los posibles responsables de esta elevada metaclogénesis (JIMENEZ ORTIZ, 1981).

MACARINI (1978) y MACARINI y CORREIA (1978) investigan, por una parte, las necesidades de crecimiento de Nocardia rhodni, actinomiceto simbiote obligado del intestino de Rhodnius prolixus, vector de T. cruzi. Encuentran que, junto con otras sustancias, requiere co

mo únicas sustancias orgánicas: acetato, tiamina, ácido glutámico o aspártico o sus amidas. Por otra parte, estudian las vitaminas excretadas por este microorganismo, detectando ácido fólico y piridoxina, no encontrando colina, riboflavina, cianocobalamina, ácido pantoténico y ácido nicotínico.

Los requerimientos vitamínicos de las formas de cultivo de T. cruzi parecen variar con el tipo de medio en que se ha realizado el estudio. Investigaciones con el medio de BONE y PARENT (1963) sugieren que estos flagelados sólo requieren tiamina y ácido fólico. Sin embargo, cuando los parásitos fueron cultivados en medios semisintético de CIPRI (1954), un mayor número de vitaminas se revelaron necesarias: tiamina, ácido fólico, riboflavina, ácido para-aminobenzoico, vitamina B<sub>12</sub>, ácido formil-tetrahidrofólico y nicotinamida.

Por otra parte, AVILA y AVILA (1981), sugieren que los epimastigotes de este flagelado pueden satisfacer, parcialmente al menos, sus requerimientos vitamínicos, pero que para altos rendimientos en el crecimiento son necesarias colina y ácido fólico.



Uno de los posibles factores, que de una manera hipotética, se barajaba por nosotros para explicar los altos porcentajes de metaciclogénesis logrados en el medio Grace modificado (OSUNA y col., 1979), era la alteración de vitaminas. Por otra parte, el hecho de que existan una serie de medios con extracto de insecto en los que se logra altos porcentajes de formas infectivas (WOOD y PIPKIN, 1969; WOOD y SOUSA, 1976, entre otros), y en base a los trabajos de JIMENEZ ORTIZ (1981) en los que llegaba a la conclusión de que la ausencia de tiamina en el medio podía estimular la metaciclogénesis, nosotros hemos estudiado la posible presencia de una tiaminasa en el extracto de Rhodnius, así como los niveles de tiamina en el medio modificado.

No hemos conseguido demostrar, por métodos espectrofotométricos (apartado 3.6.1.), una actividad tiaminasa típica en extractos de Rhodnius prolixus, pero no hay duda de que la tiamina libre desaparece del medio en presencia del extracto del insecto (apartado 4.3.1.).

Caben diversas posibilidades: que una parte relativamente grande de tiamina se una a proteínas (NISHI

MURA y col., 1984), no permitiendo quizás su detección por el método del tiocromo. Por otra parte, pudiera ser que nos encontremos ante una actividad tiaminasa de características distintas a las ya descritas para la tiaminasa I (FUJITA, 1955; WITTLIFF y AIRTH, 1970a) y la tiaminasa II (WITTLIFF y AIRTH, 1970b).

La total inactivación de estos enzimas, de cualquier fuente probada, tiene lugar tras 20 minutos de calentamiento a 80°C (tiaminasa II, WITTLIFF y AIRTH, 1970b) o a 100°C (tiaminasa I, FUJITA, 1955). Nuestra actividad quedó disminuida en un 56% tras calentamiento a 100°C durante 30 minutos (apartado 4.3.2.). Por todo ello, también debemos pensar en la posibilidad de cualquier otro enzima capaz de actuar sobre la tiamina, en nuestras condiciones experimentales, retirándola del medio.

El enzima tiaminasa I ha sido encontrado en bacterias, helechos, crustáceos y peces de agua dulce (KIMURA, 1965; MURATA, 1965).

La actividad tiaminasa II ha sido encontrada sólo en procariotas (MURATA, 1965).

Quizás la actividad manifestada por el extrac

to de Rhodnius, pudiera corresponder bien al metabolismo del propio triatómido, pues hay que recordar que naturalmente subsiste exclusivamente de sangre de mamíferos y que la cantidad de esta vitamina es realmente baja en la misma (0,01 mg/l en el hombre, TABLAS CIENTÍFICAS, 1965), o bien por los endosimbiontes que habitan en su intestino.

Desgraciadamente, nuestra cepa de Rhodnius se extinguió, impidiendo así continuar los experimentos, aunque siguen programados para una vez que repongamos la misma.

La alteración del pH a que se somete el medio, consiguió, como ya se ha expuesto anteriormente, reducir la concentración de tiamina en un 40%. Sin embargo, la vitamina restante permite el desarrollo de Lactobacillus fermentium, cepa ATCC 9338 (apartado.4.3.).

Tratando de determinar si el causante o causantes del incremento de la transformación en el medio de OSUNA y col. (1979) era ClH, NaOH o ambos, preparamos diversos medios, calculando previamente el ClH necesario para llevarlos a pH 1,5 y la cantidad de NaOH para volverlos a pH 5,8, como se indica en el apartado 3.2.4.

Los resultados, tanto para el crecimiento como para la transformación, fueron muy similares, no observándose diferencias estadísticamente significativas al comparar todos los medios entre sí (cuadro y gráfica n° 1 y 2). De ello parece deducirse que el orden del cambio de pH seguido por los autores (acidificación y posterior neutralización), así como el tiempo de acción del pH ácido o básico sobre el medio, no ejercen influencia alguna sobre el crecimiento y diferenciación de Trypanosoma cruzi.

Nuestros siguientes experimentos consistieron en preparar medio Grace, en nuestro laboratorio, al que privamos de diversas vitaminas individualmente (tiamina, ácido fólico, D-pantotenato cálcico, riboflavina y ácido nicotínico) o en grupo (colina, i-inositol, PABA, piridoxina y biotina) (apartado 3.2.4.).

De nuestros resultados (cuadros y gráficas n° 9 y 11) se deduce que tanto el ácido fólico como la tiamina, el D-pantotenato cálcico y la riboflavina (coincidiendo con otros autores como BONE y PARENT, 1963; CITRI, 1954 y AVILA y AVILA, 1981) son necesarias para el crecimiento de T. cruzi, ya que éste se vió disminuido

significativamente a nivel de crecimiento máximo ( $P < 0,007$ ,  $P < 0,04$ ,  $P < 0,04$  y  $P < 0,02$ , respectivamente). La ausencia de ácido nicotínico también disminuyó el crecimiento pero sin llegar a niveles estadísticamente significativos.

En cuanto a la transformación máxima (cuadros y gráficas nº 10 y 12), ésta no se vió significativamente alterada en ningún caso, aunque en todos ellos, excepto en ausencia de D-pantotenato cálcico (7,6%) fue claramente inferior al control (9,8%), posiblemente debido a que son necesarias tanto para el crecimiento como para la transformación.

El hecho de que la ausencia de D-pantotenato cálcico afecte significativamente al crecimiento pero no a la transformación puede suponer que esta vitamina sea importante para la división de T. cruzi, no actuando en el proceso de transformación.

En general, las curvas de crecimiento y transformación son inferiores a las de los controles, aunque no todas lleguen a ser estadísticamente significativas, lo que indica una dependencia de T. cruzi, al menos parcial, de todas las vitaminas estudiadas, coincidiendo con la opinión de AVILA y AVILA (1981).

En cuanto a las experiencias en las que, en lugar de vitaminas, se sustrajeron a los medios ácidos orgánicos (málico, succínico, alfa-cetoglutárico y fumárico), se afectó significativamente el crecimiento (cuadro y gráfica nº 15) pero no los niveles de transformación (cuadro y gráfica nº 16), siendo ambos mayores que en el control.

Según diversos autores, la acumulación de ácidos orgánicos, que conduciría a un pH ácido (5,6-6,0), sería una señal para la diferenciación. Al eliminar estos ácidos en el medio inicial, lo que hacemos es retardar la llegada al umbral de ácidos orgánicos necesarios para esta señal. Sin embargo, el sentido del cambio es hacia una mayor transformación, debida quizás a un mejor crecimiento por ausencia de estos ácidos. Pensamos que esta acumulación de ácidos orgánicos no es necesaria para la diferenciación, coincidiendo con otros autores que observan perfecta transformación a pH iguales o superiores a 7,0.

A pesar de que los resultados obtenidos con el autoanalizador de aminoácidos entre el medio de GRACE (1962) y el mismo modificado (OSUNA y col., 1979) en los que, aparentemente, no hay diferencias en los nive-

les de aminoácidos medidos, decidimos probar la influencia de determinados aminoácidos que teóricamente pueden ser lábiles a valores extremos de pH (WEST y col., 1969) en el proceso de crecimiento y transformación de Trypanosoma cruzi, ya que la aparición de  $\text{NH}_4^+$  en el medio modificado era manifiesta tras el tratamiento.

La ausencia de determinados aminoácidos lábiles a valores extremos de pH (Gln, Asn, Ser y Arg) (WEST y col., 1969), condujo a un crecimiento significativamente inferior ( $P < 0,003$ ) al del control (cuadro y gráfica nº 13), lo que indica que estos aminoácidos son importantes de cara al crecimiento de T. cruzi, especialmente Ser y/o Arg, ya que Gln y Asn son fácilmente obtenibles a partir de Glu y Asp, presentes en el medio.

Sin embargo, es de notar que a los 35 días de cultivo el número de tripanosomas/ml era similar al del control al 10º día (el control, el día 35 de cultivo, estaba totalmente agotado y permanecían vivos sólo  $1 \times 10^6$  organismos/ml).

Esto probablemente se debe a que este kinetoplasto tiene proteasas y es capaz de degradar las proteínas del suero para la utilización de sus aminoácidos

aunque no podemos descartar la posibilidad de selección de un clon de este protozoo parásito capaz de sintetizar los aminoácidos ausentes en el medio de cultivo.

La transformación no sufrió alteración significativa en ninguno de los casos (cuadro y gráfica nº 14).

Cuando se eliminaron, además, los aminoácidos Thr y Trp, también lábiles a valores extremos de pH (WEST y col. 1969), no hubo crecimiento en los 10 primeros días de cultivo, sino al contrario, un ligero decrecimiento. Transcurridos 35 días de cultivo, el número de tripanosomas/ml era, aproximadamente, 7 u 8 veces superior al inóculo, aunque aún notablemente inferior al control del día 10 de cultivo (apartado 4.1.).

Estos resultados pueden explicarse como en el caso anterior, aunque aquí, si ha habido síntesis, ha sido insuficiente para un crecimiento integral. Nosotros inclinamos, en ambos casos, por la utilización de aminoácidos procedentes de la degradación de las proteínas y péptidos séricos por acción de las proteasas de este hemoflagelado, aunque en el primer caso puede haber cierta síntesis, por lo que alcanzan niveles norma-



les de crecimiento o porque los requerimientos de aquellos aminoácidos son menores o se encuentran en las proteínas séricas en mayor proporción que Trp y Thr.

Todos los protozoos parásitos poseen la capacidad de hidrolizar proteínas en su interior celular, lo cual es un requerimiento esencial para el control del crecimiento y desarrollo. Esta autólisis rinde aminoácidos que se reutilizan para la síntesis proteica. Algunos de estos organismos también emplean proteínas exógenas como fuente de aminoácidos. En la mayoría de los casos estas proteínas son ingeridas por el protozoo, ya sea a través del citostoma o por pinocitosis o fagocitosis, en el interior de vacuolas alimenticias. Las proteínas son entonces hidrolizadas en la vacuola por las enzimas lisosomales (catepsinas y otras peptidasas), las cuales se liberan a la vacuola cuando los lisosomas se fusionan con ella.

Sin embargo, algunos protozoos parásitos, aparentemente, excretan proteasas, las cuales hidrolizan proteínas en el exterior del parásito. Los aminoácidos que se producen pueden entonces ser absorbidos (GUTTERIDGE y COOMBS, 1977).

Los epimastigotes de T. cruzi poseen un citostoma-citofaringe, el cual también existe en las formas intracelulares del parásito (MILDER y DEANE, 1969; SANABRIA y ARISTIMUÑO, 1970), pero no en la fase tripomastigota (VICKERMAN y PRESTON, 1976). Estos autores sugieren que las formas sanguíneas del protozoo podrían consumir proteínas del hospedador unidas a su membrana. MEYER y De SOUZA (1973) han demostrado que las formas intracelulares de T. cruzi pueden ingerir gránulos de melanina en cultivo de tejidos de células de iris de pollo, presumiblemente vía citostoma.

Diversas proteasas e hidrolasas han sido descritas en extractos de epimastigotes de T. cruzi (ITOW y CAMARGO, 1977; AVILA y col., 1979; BONTEMPI y col., 1984) aunque no se ha determinado aún si algunas de éstas u otras son excretadas al medio extracelular, aunque sí se ha sugerido que las hidrolasas secretadas en la bolsa flagelar pueden iniciar la digestión de material particulado (AVILA y col., 1979).

En bacterias gramnegativas, la respuesta quimiotáctica está mediada por S-adenosilmetionina, la cual es responsable de la metilación de unas proteínas

específicas insertas en la membrana citoplasmática, dependiendo el grado de respuesta quimiotáctica del número de metilos incorporados por dichas proteínas (HERRERO y col., 1984). Pensando que la diferenciación en T. cruzi se da como respuesta a señales emitidas por el medio externo ya sea in vitro (cultivo) o in vivo (recto del intestino del vector), decidimos comprobar el efecto de la ausencia de metionina, aminoácido esencial, del medio Grace.

Observamos que, aunque la curva de crecimiento es algo inferior (cuadro y gráfica nº 13), no hay diferencias significativas, al igual que en la transformación (cuadro y gráfica nº 14), pero en ésta, los valores son claramente distintos. Así, mientras que en el control es de 9,8%, en ausencia de metionina es de 2,6%. Por ello, podemos sugerir que la metionina es necesaria para la transformación, aunque quizás la existencia de este aminoácido en el suero no ha permitido un análisis correcto del efecto de su ausencia para la metaciclologénesis.

El hecho antes apuntado de la necesidad de un consumo previo de nutrientes por parte de las formas no

infectivas para inducir a la transformación (CAMARGO, 1964 y CHIARI y CARNEIRO, 1978b), nos condujo a plantear unas experiencias con medios en los que se eliminaron los monosacáridos (glucosa y fructosa). Se comprobó que el crecimiento (cuadro y gráfica nº 15) era excelente, mejor que en los controles ( $P < 0,009$ ). El porcentaje de diferenciación fue más alto (36,6%) que en los controles (10,3%), con diferencia altamente significativa ( $P < 0,0001$ ) (cuadro y gráfica nº 16).

No hay discusión posible sobre la importancia de las concentraciones bajas de monosacáridos utilizados como sustratos por T. cruzi, clara en esta experiencia, tanto para un buen crecimiento como para una buena metaciclogénesis.

Otros autores suponen que el agotamiento de la glucosa y el acúmulo de ácidos orgánicos, que conducen a un pH ácido adecuado del medio, disparan la transformación. Nosotros proponemos que niveles bajos (o ausencia) de sustratos monosacáridos utilizados por este parásito, son los que disparan esta diferenciación que, como aseguran otros autores, es independiente del acúmulo de ácidos orgánicos y del pH, aunque en este caso,

el pH inicial usado es de 5,6-5,7.

Cuando se disminuyó la concentración de sacarosa del medio (GP1), no hubo cambios significativos respecto al control (GP0), aunque el crecimiento máximo aumentó ligeramente y la diferenciación disminuyó hasta el 6,5% (cuadro y gráfica nº 15 y 16). La eliminación de mayores cantidades de sacarosa del medio condujeron a la deformación y redondeamiento de los parásitos debido, probablemente, a la hipotonicidad del medio.

Habiendo conseguido así un medio con buena transformación, decidimos trabajar paralelamente con él para ensayar si los productos de la hidrólisis de la tiamina podrían tener algún efecto sobre la diferencia-ción, como apuntaba JIMENEZ ORTIZ (1981). Se prepararon una serie de medios: un control de Grace completo (GP0) otro sin monosacáridos (GP5) y otro sin monosacáridos ni tiamina (GP2). Los problemas se hicieron con GP2 al que se añadió el derivado sulfónico del grupo pirimidí-nico de la tiamina (GP2A), el grupo tiázólico de la misma a otro (GP2B) y a un tercero (GP2C) ambos.

El crecimiento en todos los casos fue bueno (cuadro y gráfica nº 15 y 17), incluso mejor que el con

trol (GPO), llegando a ser estadísticamente significativo para GP5 ( $P < 0,009$ ), GP2 ( $P < 0,03$ ) y GP2C ( $P < 0,05$ ) aunque no para GP2A y GP2B, debido a sus mayores errores estándar, ya que el crecimiento fue similar.

En cuanto al porcentaje de diferenciación, en todos los casos fue significativamente más alto que el control (GPO) (10,3%) (cuadro y gráfica nº 16 y 18). Al comparar estadísticamente el resto de los cultivos entre ellos, ninguno fue distinto de los otros, excepto GP2A y GP2B ( $P < 0,04$ ). Es de notar que GP2A tiene un porcentaje de diferenciación claramente menor (22%) que el resto de los casos, siempre superiores al 32%.

De esta experiencia deducimos que ni la tiamina ni los productos de sus hidrólisis influyen, al menos de forma evidente, ni positiva ni negativamente, sobre la metaciclologénesis, como sugería JIMENEZ ORTIZ (1981).

Por último, tratamos de conjuntar los dos factores, uno físico y otro químico, que, en nuestro trabajo, habían dado resultados positivos en el mejoramiento del porcentaje de metaciclologénesis.

Preparamos Grace control (GPO), Grace control

con 100 meq de ClNa adicionado (GPO-ClNa<sup>4</sup>), Grace sin monosacáridos (GP5) y Grace sin monosacáridos con 100 meq/l de ClNa añadidos (GP5-ClNa<sup>4</sup>). De esta experiencia resultó que el crecimiento en todos los casos fue similar, aunque superior al control GPO, excepto para GP5 que fue significativamente mayor ( $P < 0,05$ ) (cuadro y gráfica n° 19). Sin embargo, la transformación mejoró conforme se tenía en cuenta uno o los dos factores considerados (cuadro y gráfica n° 20). Así resultó una significación con respecto al control GPO (9,7% de transformación) para GP5 de  $P < 0,003$  (34,9%), para GPO-ClNa<sup>4</sup> de  $P < 0,0001$  (43,3%) y para GP5-ClNa<sup>4</sup> de  $P < 0,0001$  (64,5%). Al compararse estadísticamente unos con otros, sólo no resultó significativa la diferencia entre GP5 y GPO-ClNa<sup>4</sup>, ya que se trataba de dos factores distintos activando la diferenciación por separado.

FERNANDES, en dos de sus trabajos (FERNANDES y col., 1969 y CACERES y FERNANDES, 1976) insiste en afirmar, sin mostrar resultados, que en medios libres de glucosa, al adicionar ácido pirúvico, ácido acético o ácido málico, la diferenciación se veía estimulada, siempre que el pH inicial estuviese entre 5,5 y 6,0. Nosotros, en medios pobres en glucosa (sólo llevan la

que proporciona el SBFI con que se suplementa el medio Grace), a pH 5,6-5,7, obtenemos un importante incremento de la metaciclogénesis, sin necesidad de adicionar ácidos orgánicos. FERNANDES no dice cuál es la composición de sus medios y si llevan o no suero.

Pensamos que la escasez o falta de glucosa o sustrato monosacárido adecuado en el medio, una presión osmótica relativamente alta y una concentración de  $\text{Na}^+$  determinada (o relación  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ ), pueden ser las condiciones que se encuentre Trypanosoma cruzi en el recto de su hospedador invertebrado. Estas condiciones actúan como señales sobre el epimastigote que inducen una respuesta del parásito dirigida en el sentido de la transformación a metacíclico. Quizás las lectinas aisladas del intestino del vector por PEREIRA y col., (1980) y PEREIRA y col., (1981) interaccionen con la membrana del epimastigote dificultando la entrada activa de la glucosa para su metabolización, o que las glicoproteínas de superficie a las cuales se unen, estén implicadas en el transporte activo de iones y metabolitos.

Se ha demostrado que los niveles de AMPc intracelular modulan el metabolismo y el nivel de creci -



miento en células procariotas y eucariotas (PASTAN y col. 1975; PRASAD, 1975 y MALLICK y HERRLICH, 1979). También hay evidencias de que el AMPc regula el proceso de diferenciación y proliferación celular en tripanosomátidos (STRICKLER y PATTON, 1975; KAUSHAL y col., 1980 y MANCINI y PATTON, 1981). Así mismo, elevados niveles de esta sustancia provocan una inhibición de la síntesis de DNA con la consiguiente inhibición de la división celular (OLIVEIRA y col., 1984). Igualmente es sabido, pero no explicado, que cuando los niveles de glucosa disponibles para una célula disminuyen, paralelamente aumentan los niveles de AMPc intracelular (MAHLER y col., 1981).

Proponemos la posibilidad de que niveles bajos de glucosa induzcan en epimastigotes el aumento de los niveles de AMPc intracelulares, conduciendo a una inhibición de la síntesis de DNA y de la división celular y provocando así la diferenciación a forma metacíclica, fase de vida de T. cruzi incapaz de dividirse. Experiencias preliminares en este sentido, realizadas en nuestro laboratorio, parecen avalar esta posibilidad.

En cuanto a la relación  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ , se han medido los  $\text{meq}/\text{l}$  de  $\text{Na}^+$  y de  $\text{K}^+$  en la orina de Dipetalogaster ma-

ximus, vector de T. cruzi, siendo de 148,0 y 6,5, respectivamente (ZELEDON y col., 1977) y siendo su relación de 22,77.

En el medio control utilizado por nosotros, las concentraciones de  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$  son 25 y 75 meq/l, respectivamente, y en el de mayor transformación son de 125 y 75 meq/l, respectivamente. La proximidad de los valores de concentración de  $\text{Na}^+$  quizás son la causa de la buena diferenciación in vitro y no otros factores físicos, aunque deberíamos considerar la conjunción de dos factores: la concentración de  $\text{Na}^+$  adecuada junto con la presión osmótica pertinente.

En estas experiencias el pH inicial fue de 6,4, pero como ya hemos mencionado anteriormente que el pH de la orina de vectores de este parásito varía entre 6,6 y 8,5, no podemos considerar que el pH sea un factor que intervenga en la metacicloogénesis, coincidiendo con la opinión de LANAR (1979), LOPETEGUI y col. (1982) y UCROS y col. (1983). Por su parte, CONTRERAS y col. (1985) han conseguido un importante porcentaje de diferenciación (85%) con bajo crecimiento, en un medio que imita la composición salina de la orina de triatómidos

suplementado con un 10% de suero bovino de recién nacido.

Otros factores que intervienen en el porcentaje de metacíclicos obtenidos son la cepa del protozoo y el tiempo de mantenimiento en el laboratorio en cultivos seriados in vitro, pues cuanto más tiempo ha transcurrido desde su aislamiento in vivo, menor es la transformación obtenida. Esto parece ser debido a que, como se ha demostrado trabajando con clones aislados, éstos tienen distintas capacidades de transformación, incluso algunos carecen de esta propiedad. Estos se ven favorecidos por el subcultivo in vitro, pues los que se diferencian mueren sin descendencia, empobreciéndose el cultivo en formas capaces de transformarse (CHIARI, 1974; CRANE y DVORAK, 1982; GARCIA y DVORAK, 1982).

## 5.2.- PRODUCCION DE NH<sub>4</sub><sup>+</sup> POR Trypanosoma cruzi.

De la propiedad de las formas epimastigotas de T. cruzi de producir amonio, conociendo que esta base puede ser capaz de inhibir la fusión lisosómal de las células hospedadoras (GORDON y col., 1980), se desprende la necesidad de conocer si los amastigotes de T. cruzi son capaces de producir amonio y si éste es el mecanismo utilizado por ellos para inhibir la fusión lisosomal.

De nuestras experiencias se demuestra la producción de amonio por estas formas liberadas por las células (apartado 4.4.). En trabajos anteriores realizados en nuestro laboratorio (GAMARRO CONDE, 1984; OSUNA y col., 1985a) se demostraba que las formas intracelulares del parásito actuaban sobre los lisosomas impidiendo la fusión de éstos con las vacuolas endocíticas. Igualmente hemos demostrado, por procedimientos indirectos, que esta inhibición no se produce por poliaminas, como se había sugerido por algunos autores, y sí por cloruro amónico (OSUNA y col., 1985b). Así mismo hemos

comprobado que la producción de amonio en células parasitadas es superior a las de las células control (resultados no mostrados).

Todos estos indicios nos permiten sugerir que la inhibición de la fusión lisosomal por amastigotes de T. cruzi podría realizarse por el amonio excretado por él mismo o el producido por el propio metabolismo celular, activado de alguna forma desconocida por la interiorización o presencia del parásito en el citoplasma celular.

La precipitación de estruvita ( $\text{PO}_4(\text{NH}_4)\text{Mg}_6\text{H}_2\text{O}$ ) observada en cultivos viejos en medio Grace (apartado 4.5.) puede deberse a una elevada presión osmótica del medio, ya que no hemos observado diferencias significativas en la producción de amonio entre los medios estudiados. La presión osmótica del medio Grace + 10% de SBFI es de, aproximadamente, 375 mOsm y la de los medios Grace modificados, estudiados aquí, es de 550-575 mOsm.

SHINANO y SAKAI (1975), trabajando con Pseudomonas calciprecipitans, llegan a la conclusión de que la relación  $\text{Mg}^{2+}/\text{Ca}^{2+}$  es el más importante de los facto

res que controlan los tipos de cristalización en el medio, obteniendo estruvita siempre que esta relación es igual o superior a 4 (en peso).

Trabajando con bacterias de agua dulce FERRON-VILCHES y col. (1984) observan que el número de cepas productoras de estruvita es máximo cuando la relación fosfato/magnesio del medio de cultivo es 1, disminuyendo dicho número si la concentración de  $Mg^{2+}$  se eleva.

Nosotros hemos obtenido precipitación de cristales de estruvita sin modificar ninguna de estas relaciones en el medio original.

RIVADENEYRA y col. (1983) sugieren que las bacterias pueden tener un claro papel en el proceso de formación natural de estruvita, como sugería MORITA (1980) para la formación de calcita, actuando como núcleo para una precipitación no biológica. Igualmente afirman que la producción de amonio por cepas no productoras de estruvita indica que esta excreción por tales bacterias no es el único factor causante de la precipitación de este cristal, aunque puede influir, indicando la existencia de otros factores incluidos en el proceso y que aún están por determinar.

Basándonos en esto, nosotros sugerimos que, si realmente otros factores y no sólo la excreción de amonio están incluidos en la precipitación de estruvita, quizás los protozoos de vida libre también hayan contribuido a la formación de depósitos naturales de estruvita y de otros minerales, y que la presencia de esta capacidad en un protozoo. parásito puede deberse a una propiedad no perdida en el proceso de evolución desde su forma de vida libre hasta la de vida parasitaria.

De los resultados obtenidos de la evolución de un cultivo en medio Grace + 100 meq ClNa/l, en los que precipitan espontáneamente cristales de estruvita (cuadro nº 22), se desprende que al 8º día de cultivo finaliza la fase de crecimiento exponencial, mostrando el pH más bajo de todo el cultivo. A partir de este momento el pH comienza a ascender rápidamente, la producción de amonio sigue un proceso ascendente y el consumo de glucosa comienza a disminuir lentamente hasta su agotamiento.

Todo esto parece indicar un cambio del metabolismo glucídico al proteico, provocado por el agotamiento del sustrato glucídico exógeno, con la consiguiente

producción de amonio que provoca una elevación del pH  
Ya en 1949, Von BRAND y col., preconizaban este cambio  
de metabolismo. Poco después, TOBIE y col. (1950) y RY-  
LEY (1956) confirmaban la producción de amonio por Try-  
panosoma cruzi y más recientemente, YOSHIDA y CAMARGO  
(1979) clasifican a este parásito como amoniotélico.



### 5.3.-METABOLISMO GLUCIDICO DE Trypanosoma cruzi.

La existencia de la vía glucolítica, del ciclo de las pentosas y del ciclo de Krebs es conocida en Trypanosoma cruzi, tanto en las formas epimastigotas de cultivo como en las amastigotas intracelulares y tripomastigotas sanguíneas o procedentes de cultivo en células Vero.

Pero, hasta ahora, los estudios metabólicos sobre las formas infectivas metacíclicas de este parásito han sido muy escasos.

La importancia que el conocimiento de su metabolismo puede tener a la hora de investigar los mecanismos de interiorización del parásito en la célula hospedadora, así como en la búsqueda de quimioterápicos eficaces que actúen bloqueando aquellos pasos metabólicos más importantes para la vida o para la interiorización del flagelado, nos ha inducido a realizar este primer estudio que abra paso y sirva de base a estudios más profundos, no sólo en el área del metabolismo glucídico, sino en todos los procesos bioquímicos de las formas infectivas de este protozoo.

Para una mejor comprensión de los resultados, conociendo que para cepas distintas del parásito se obtienen resultados cuantitativamente distintos, decidimos realizar el estudio comparativamente con las formas epimastigotas de cultivo de nuestra cepa.

Se inició este estudio con el análisis de la producción de  $^{14}\text{CO}_2$  a partir de D-(U- $^{14}\text{C}$ )-glucosa por ambas formas del tripanosoma.

De nuestros resultados se deduce una relación entre el número de kinetoplastos y la liberación de  $^{14}\text{CO}_2$ , parabólica para los epimastigotes y lineal para los metacíclicos, pero siendo en éstos claramente inferior (20% de la de los epimastigotes, a 100 millones de organismos).

En principio, esto podría achacarse a que tanto la glucólisis como el ciclo de los ácidos tricarbóxicos funcionan en las formas infectivas a una velocidad inferior a la de las no infectivas. Sin embargo, el hecho de que la actividad específica de las enzimas del ciclo de Krebs sea significativamente mayor en los tripanomastigotes metacíclicos, nos hace pensar en la posibilidad de que, en estas formas, parte de la glucosa sea des-

viada hacia otras rutas, como puede ser la síntesis de polisacáridos de membrana, y que parte del  $\text{CO}_2$  desprendido sea recuperado por una elevada actividad de los enzimas fijadores de  $\text{CO}_2$ , fijación que se ha demostrado de relevancia en el metabolismo de kinetoplástidos (KLEIN y col., 1975), en general, y de epimastigotes de T. cruzi, en particular (BOWMAN y col., 1963).

T. cruzi cataboliza la glucosa sólo parcialmente a  $\text{CO}_2$ , incluso bajo condiciones aerobias, produciendo una sustancial cantidad de ácidos orgánicos, especialmente succinato (BOWMAN y col., 1963; BOWMAN, 1974). La síntesis de succinato, la cual mantiene el balance redox celular de los coenzimas nucleótidos de la nicotinamida (BOWMAN, 1974), requiere la fijación de  $\text{CO}_2$  a ácidos  $\text{C}_3$  (BOWMAN y col., 1963).

En un principio se detectaron, como posibles enzimas fijadores de  $\text{CO}_2$ , la enzima málica ligada a NADP y la fosfoenolpiruvatocarboxikinasa (PEPCK) ligada a ADP en epimastigotes de T. cruzi (CATALDI De FLOMBAUM y col., 1977), mientras que para otros tripanosomátidos, además de éstas, se encontró actividad piruvato-carboxilasa, pero en baja proporción (KLEIN y col., 1975).

Pero, actualmente, se tiene el convencimiento de que el principal y más activo enzima que actúa fijando  $\text{CO}_2$  es PEPCK ligado a ADP, detectándose en la fracción glicosomal de T. cruzi y otros tripanosomátidos. (CANNATA y col., 1982).

Por otra parte, hemos seguido la evolución de la producción de  $^{14}\text{CO}_2$  por las formas epimastigotas de cultivo de T. cruzi (cuadro nº 24) observando una brusca disminución de dicha liberación, cuando el cultivo alcanza la fase estacionaria de crecimiento. En esta fase, la concentración de glucosa en el medio es muy baja (cuadro nº 22) y, según parece, no utilizable (Von BRAND y col., 1949), por lo que el tripanosoma debe adaptarse a la utilización mayoritaria de otros sustratos (¿aminoácidos?, ¿ácidos grasos?,...), por ello, al colocarse de nuevo en un medio con suficiente glucosa, debe readaptarse a su consumo preparando el equipo enzimático necesario para su rápida y eficaz catabolización. El escaso tiempo en el que se realiza la experiencia (1 hora) es probablemente insuficiente para esta adaptación, pero, indudablemente, ésta se inicia, lo que podría explicar las mayores desviaciones a que está sometida la determinación del

$^{14}\text{CO}_2$  liberado por las formas metacíclicas y por las formas epimastigotas de la fase estacionaria (cuadros nº 23 y 24).

Al estudiar estos resultados se deduce que existen diferencias, a nivel de metabolismo glucídico, entre las formas epimastigotas en fase de crecimiento exponencial y las formas metacíclicas. Por ello, procedimos a analizar la glucólisis de ambas formas, determinando la actividad de los enzimas clave de la misma, es decir, hexokinasa, fosfofructokinasa y piruvato kinasa.

La glucosa, que se encuentra en el medio de cultivo, penetra en los epimastigotes de Trypanosoma cruzi por un mecanismo de transporte activo, si se halla a baja concentración, y por difusión facilitada, si la concentración es alta (WARREN y PATRZECK, 1963). Así mismo, se ha observado, por los mismos autores, que la glucosa inhibe parcialmente el consumo de otras hexosas, tales como fructosa y galactosa, y que ésta última no se absorbe contra gradiente, al contrario de lo que ocurre con la fructosa. Por otra parte, esta absorción de los azúcares es fuertemente dependiente de la temperatura (WARREN y PATRZECK, 1963).

Aunque en Trypanosoma cruzi no se ha demostrado, en otros flagelados, como T. lewisi, T. gambiense, T. equiperdum, Crithidia luciliae y Leishmania tropica, se ha comprobado la existencia de dos caminos o sitios de entrada diferentes para los carbohidratos, aunque los azúcares transportados por cada uno de ellos no coinciden de una especie a otra (Von BRAND, 1979).

Se cree que en los tejidos animales la glucosa y otros metabolitos, tales como aminoácidos, son transportados al interior celular mediante un transportador que, a su vez, requiere la presencia de  $\text{Na}^+$  externo. Puesto que la bomba expulsora de  $\text{Na}^+$  mantiene un gradiente descendiente de iones sodio hacia el interior, el flujo de estos iones hacia dentro, que responde al gradiente, hace posible el transporte de glucosa contra su propio gradiente (LEHNINGER, 1972).

Parece ser que el transportador de aminoácidos es del mismo tipo que el de la glucosa, pues también requiere iones sodio (LEHNINGER, 1972). Es interesante mencionar que existen interacciones, a nivel de transporte, entre aminoácidos y carbohidratos (inhibición o estimulación del influjo o eflujo) en numerosos organismos y tejidos. Entre los primeros se encuentran algunos tripa-

nosomátidos en los que la glucosa afecta el transporte de aminoácidos, como Leishmania mexicana, L. donovani (DECKER y JANOVY, 1974) y Trypanosoma equiperdum (JACKSON y FISHER, 1977), aunque también se ha descrito el efecto de los aminoácidos sobre el consumo de glucosa en T. lewisi (SANCHEZ, 1974).

Una vez que la glucosa se encuentra en el interior celular, es liberada por el transportador y fosforilada para evitar su salida, por difusión facilitada, cuando la concentración exterior es baja. Esta fosforilación es llevada a cabo por el enzima hexokinasa, el cual utiliza  $ATP-Mg^{2+}$  para producir D-glucosa-6-fosfato.

Este enzima puede fosforilar otros sustratos, además de la glucosa, con una eficiencia relativamente alta. Así en epinastigotes de T. cruzi, tomando el coeficiente de fosforilación de la glucosa como 100, se obtiene una fosforilación de 72-100 para la 2-desoxi-D-glucosa, 31-97 para la D-fructosa, 40-69 para la D-manosa, 15-62 para la glucosamina y valores inferiores para otros azúcares (las variaciones en los porcentajes son debidas, probablemente, a la diferencia de cepas y técnicas utilizadas). No fosforile azúcares tales como la galactosa, sorbosa, xilosa, sorbitol, manitol y 5-tioglucosa (RACAGNI y MACHADO DE DOMENECH, 1983; URBINA y CRESPO, 1984).

Como inhibidores competitivos de la hexokinasa frente a la glucosa se han detectado N-acetil-glucosamina ( $K_i = 0,3 \text{ mM}$ ), 5-tio-glucosa ( $K_i = 0,4 \text{ mM}$ ), fructosa-6-fosfato y glucosa-6-fosfato (producto de la reacción), estos dos últimos de acción muy débil ( $K_i = 2,63$  y  $1,45 \text{ mM}$ , respectivamente), aunque en la cepa Tulahuen no se detectó inhibición por producto ni por sustrato (RACAGNI y MACHADO De DOMENECH, 1983; URBINA y CRESPO, 1984).

Estos mismos autores obtuvieron una  $K_m$  para la D-glucosa de  $0,04 \text{ mM}$  y  $0,09 \text{ mM}$ , y el pH óptimo osciló entre  $7,4$  y  $8,2$ .

En las formas metacíclicas, TAHIRA y col., (1978) comunican la especificidad del enzima para ATP- $\text{Mg}^{2+}$  y sus capacidad para fosforilar D-glucosa y D-fructosa e inhibirse por acción de p-cloro-mercuribenzoato y p-hidroxi-mercuribenzoato. Obtienen el pH óptimo ( $9,0$ ) y la temperatura óptima ( $37^\circ\text{C}$ ) de acción.

Por nuestra parte, trabajando a  $37^\circ\text{C}$  y pH  $7,6$ , hemos obtenido una  $K_m$  de  $0,025 \text{ mM}$  para los epimastigotes y de  $0,035 \text{ mM}$  para los metacíclicos.

Los anteriores autores obtienen una cinética de saturación hiperbólica para las formas epimastigotas



con respecto al sustrato. Nosotros obtenemos los mismos resultados tanto en las formas infectivas como en las no infectivas, no encontrando en ningún caso inhibición por exceso de sustrato (15 mM) (gráfica nº 23).

La velocidad máxima ( $V_{m\acute{a}x}$  en nmoles/min/mg proteína) del enzima para las formas no infectivas fue de 99 y de 54 para las metacíclicas (cuadro nº 25). URBINA y CRESPO (1984), con el enzima parcialmente purificado (6-8 veces), calculan un valor de  $V_{m\acute{a}x}$  de 440, mientras que RACAGNI y MACHADO De DOMENECH (1983) consiguen 1,2 unidades/mg proteína de un extracto de epimastigotes (de su fracción soluble a 40000 x g tratada con Tritón X-100 al 0,1%).

URBINA y CRESPO (1984) también probaron numerosos efectores o moduladores metabólicos, como fosfoenolpiruvato, D-fructosa-1,6-bisfosfato, D-glucosa-1,6-bisfosfato, citrato y malato (2 mM o más), sin efecto significativo, lo que indica una baja regulación metabólica de este enzima, a diferencia de los enzimas de mamíferos (LEHNINGER, 1972).

ROGERSON y GUTTERIDGE (1980) determinaron la actividad específica de diversos enzimas de las formas

epimastigotas de cultivo, amastigotas intracelulares y tripomastigotas sanguíneas, obteniendo, para la hexokinasa, los valores de 84 (a 28°C), 27 (a 37°C) y 155 (a 37°C) nmoles/min/mg proteína, respectivamente, trabajando con el extracto soluble a 18000 x g. Mientras, TAYLOR y col. (1980), determinaban valores de 75, 31 y 32 nmoles/min/mg proteína, a las mismas condiciones de temperatura que los anteriores, de homogenados totales solubilizados con Tritón X-100, al 0,1%, de las tres formas indicadas, respectivamente.

Los valores obtenidos por nosotros son lo suficientemente próximos a los de otros autores como para suponer que las diferencias se deben, fundamentalmente, a la cepa empleada y a nuestras condiciones experimentales. De ello, deducimos que los datos obtenidos para las formas metacíclicas son igualmente correctos.

La D-glucosa-6-fosfato, una vez formada, se isomeriza a D-fructosa-6-fosfato, por acción del enzima fosfoglucoisomerasa.

El siguiente punto de control del proceso glucolítico, y sin duda el más importante en sistemas celulares eucarióticos, lo constituye la fosforilación de

la D-fructosa-6-fosfato por medio de ATP-Mg<sup>2+</sup> y el curso del enzima fosfofructokinasa.

URBINA y CRESPO (1984) obtienen un comportamiento hiperbólico durante el desarrollo cinético de este enzima parcialmente purificado (4-6 veces), que evidencia una cinética simple de Michaelis-Menten, sin rasgos de sigmoicidad, con respecto a la D-fructosa-6-fosfato, su sustrato, calculando una Km de 1,31 mM y una Vmáx de 400 nmoles/min/mg proteína, a pH 7,4 y a 25°C.

En nuestras condiciones experimentales (pH 8,0, 37°C, 2 mM de AMP) obtenemos una Km de 0,29 mM y una Vmáx de 40 nmoles/min/mg proteína para epimastigotes y de 0,15 y 14, respectivamente, para metacíclicos (cuadro n° 26). En ambos casos la cinética es hiperbólica (gráfica n° 24), similar a la que obtienen URBINA y CRESPO (1984) cuando determinaron la actividad fosfofructokinasa en presencia de 5'-AMP, el cual actúa como modulador positivo, disminuyendo la Km hasta 0,21 mM sin modificar la velocidad máxima.

Estos autores también comprueban la concentración óptima de ATP, que estiman en 1 mM, observando que concentraciones mayores son inhibitorias (2 mM conduce

a una inhibición del 30% de la actividad fosfofructokinasa). Así mismo, calculan el pH óptimo de la reacción, situándolo en el intervalo de 6,9 a 7,5.

Nosotros hemos utilizado 2mM de ATP y pH 8,0. Por ambos motivos nuestra  $V_{m\acute{a}x}$  queda reducida, ya que la utilización de AMP sólo conduce a un aumento de la afinidad del enzima por el sustrato sin modificar la  $V_{m\acute{a}x}$  en epimastigotes de T. cruzi (URBINA y CRESPO, 1984)

ROGERSON y GUTTERIDGE (1980) obtuvieron los siguientes resultados de actividad específica para los extractos, anteriormente mencionados, de formas epimastigotas, amastigotas y tripomastigotas sanguíneas: 252 (a 28°C), 160 (a 37°C) y 172 (a 37°C) nmoles/min/mg proteína, respectivamente. Mientras tanto, TAYLOR y col. (1980) obtenían 62, 28 y 73 nmoles/min/mg proteína, respectivamente, a las temperaturas y de los extractos completos ya citados.

Los efectores que actúan sobre la actividad fosfofructokinasa de células de vertebrados (UNDERWOOD y NEWSHOLME, 1967), bacterias (BLANGY y col., 1967) y plantas (KELLY y TURNER, 1968) parecen no ejercer ninguna acción sobre el enzima de epimastigotes de T. cruzi,

según se desprende de los resultados de URBINA y CRESPO (1984) con citrato, L-malato, succinato, D-glucosa-6-fosfato, fosfoenolpiruvato e iones fosfato y amonio. Es to indica que este enzima, al igual que la hexokinasa y al contrario que el de gran número de células eucariotas, está poco regulado.

Sin embargo, el comportamiento cinético obtenido para las formas metacíclicas demuestra claramente que ambos enzimas sufren un proceso de represión enzimática durante la transformación de las formas epimastigotas a metacíclicas. Como consecuencia, la forma metatripomastigota de T. cruzi presenta una menor concentración de enzima que se traduce en una disminución proporcional en las velocidades iniciales del enzima.

Este hecho es particularmente exacto en el análisis de la actividad hexokinasa, ya que la proporción de velocidad se mantiene a lo largo de su cinética, desde concentraciones subsaturantes a las de velocidad máxima (cuadro nº 25).

En el caso de la fosfofructokinasa, aunque su comportamiento es similar, parece existir, asociado a él, un mecanismo de inhibición que se manifiesta mayori

tariamente en los casos de concentración saturante de sustrato. No obstante, hay que hacer notar que incluso en estas condiciones las formas metacíclicas de T. cruzi siguen manteniendo un metabolismo relativamente activo de la glucosa que les llega. Varias son las razones que explican este hecho: En primer lugar, tal y como muestran los resultados obtenidos, la hexokinasa presenta una reducida Km, del orden de  $3,0 \times 10^{-5}$  M, lo que hace posible que toda la glucosa celular sea atrapada por el enzima.

En segundo término, porque aunque la actividad específica de la hexokinasa a concentraciones celulares sea la mitad de la encontrada en las formas epimastigotas, ésta es lo suficientemente alta como para convertir toda la glucosa que les llega en su producto fosforilado.

Por lo que respecta a la fosfofructokinasa, habría que resaltar, cuando se comparan las actividades del enzima en las diferentes formas del tripanosoma, su doble comportamiento a lo largo de su desarrollo cinético.

A concentraciones saturantes de sustrato es

evidente que existe una mayor actividad en las formas epimastigotas, del orden del 300% del encontrado en los metacíclicos, sin embargo a concentraciones celulares de sustrato (aproximadamente, 0,05-0,07 mM) la actividad es prácticamente igual o ligeramente mayor, lo que determina que los porcentajes de velocidad subsaturante frente a velocidad máxima sean del 16% para los epimastigotes y cerca del 40% para los metatripomastigotes, explicando de esta manera la existencia de un metabolismo relativamente activo de la glucosa ( cuadro nº26).

Resultados similares a los de URBINA y CRESPO (1984) se han obtenido con las fosfofructokinasas de Crithidia fasciculata (OZANICH y MARR, 1976), Leishmania donovani y L. braziliensis (BERENS y MARR, 1977a), aunque en éstos la cinética fue sigmoideal frente al sustrato, fructosa-6-fosfato, convirtiéndose en hiperbólica a concentraciones saturantes de AMP, el cual, además de reducir la Km, incrementa la Vmáx de este enzima (BERENS y MARR, 1977b).

Comportamientos similares se han encontrado en otros tripanosomas, como T. brucei (NWAGWU y OPPERDOES, 1982). Esto sugiere que el flujo glucolítico no está

acoplado a las reacciones que rinden energía, como las del ciclo de Krebs.

Por otro lado, la cinética hiperbólica simple ha sido hallada en fosfofructokinasas procedentes de organismos que no usan glucosa como fuente primaria de energía, tales como la bacteria Arthrobacter crystallopoietes (FERDINANDUS y CLARK, 1969) o el moho del fango Dyctyostelium discoideum (BAUMANN y WRIGHT, 1968), los cuales tampoco responden a los efectores que actúan en el enzima de vertebrados, bacterias o plantas.

En 1977, OPPERDOES y BORST, hallaron en las formas sanguíneas de T. brucei indicios de la existencia, en la fracción de densidad correspondiente a 1,23 g/cm<sup>3</sup> de una centrifugación en gradiente isopícnico de sacarosa, un microsoma en el que detectaron actividad de nueve enzimas que intervienen en el proceso glucolítico (hexokinasa, fosfoglucoisomerasa, fosfofructokinasa, aldolasa, triosafosfato-isomerasa, glicerolkinasa, glicerol-3-fosfato deshidrogenasa y fosfoglicerato kinasa) que permiten la conversión de la glucosa y el glicerol en 3-fosfoglicerato. Este microsoma fue denominado "glicosoma". Este orgánulo se ha encontrado exclusiva-



mente en kinetoplástidos como Crithidia fasciculata (TAYLOR y col., 1980), en C. luciliae, formas procíclicas de T. brucei (OPPERDOES, 1981) y formas promastigotas de Leishmania mexicana mexicana (COOMBS, 1981), de L. tropica major, L. donovani y L. braziliensis braziliensis (HART y OPPERDOES, 1984).

También en T. cruzi se ha hallado este orgánulo, tanto en sus formas epimastigotas de cultivo, como amastigotas intracelulares y tripomastigotas sanguíneas (TAYLOR y col., 1980), detectando los enzimas hexokinasa, fosfofructokinasa y aldolasa. Posteriormente, se ha encontrado actividad fosfoenolpiruvatocarboxikinasa (CANNATA y col., 1982) y una de las dos malato deshidrogenasas que contienen las formas epimastigotas (CANNATA y CAZZULO, 1984).

Además de los enzimas mencionados, también se han hallado en glicosomas los dos últimos enzimas de la biosíntesis de la pirimidina (orotato-fosforribosiltransferasa y orotidín-carboxilasa) (HAMMOND y col., 1981), así como adenilato kinasa, malato deshidrogenasa (OPPERDOES y col., 1981) y fosfoenolpiruvatocarboxikinasa (OPPERDOES y COTTEM, 1982). Por otra parte, se han

encontrado enzimas implicadas en la beta-oxidación de ácidos grasos, como la 3-beta-hidroxi-butirilcoenzima-A-deshidrogenasa, y un enzima clave en la síntesis de éteres lipídicos, como la dihidroxiacetona-fosfato-acetil-transferasa (HART y OPPERDOES, 1984).

La presencia de muchos de los enzimas glucolíticos en el interior de un orgánulo es una propiedad única de los representantes de la familia Trypanosomatidae. En ningún otro organismo estudiado, ni procarionta ni eucariota, se ha detectado este orgánulo y la glucólisis se realiza en la fracción soluble del citoplasma. Esto sugiere a OPPERDOES (1983) que los enzimas glucolíticos, presentes en el interior del glicosoma, podrían exhibir propiedades físicas y químicas características que los diferencien de los enzimas glucolíticos solubles de la célula de su hospedador, pudiendo convertirse en excelentes puntos de acción para la futura quimioterapia.

En células eucariotas (OTTAWAY y MOWBRAY, 1977) y en bacterias (MOWBRAY y MOSES, 1976) ya se había observado la existencia de ciertas interacciones débiles entre los enzimas glucolíticos. Estas interacciones

también se han encontrado entre los enzimas que se hallan en el glicosoma, pero la evidencia es que son mucho más fuertes que las de otros organismos, formando un verdadero y gran complejo multienzimático (ODURO y col., 1980 OPPERDOES y NWAGWU, 1980).

La actividad fructosa bisfosfatasa parece estar igualmente ligada al glicosoma, al menos así se desprende de los estudios de este orgánulo en Leishmania m. mexicana (COOMBS, 1981; COOMBS y col., 1982). Esta actividad gluconeogénica aún no había sido detectada en T. cruzi. Nosotros hemos sido capaces de detectarla en formas epimastigotas y en formas metacíclicas, observándose que su baja actividad en las primeras se ve aún más reducida en las formas infectivas, necesitando gran cantidad de proteínas para detectarlo, cuestión nada fácil de resolver teniendo en cuenta la dificultad de obtener tripomastigotes en número suficiente. De todas formas, se ha detectado una actividad de 1,46 nmoles/min/mg proteína en estos últimos a 0,075 mM, observándose alguna inhibición por sustrato a 0,25 mM (19%).

Hemos realizado unos primeros estudios preliminares de este enzima en las formas epimastigotas ob-

servando que su actividad es mayor, a una concentración de sustrato de 0,05mM, a 37°C que a 28°C, produciéndose una inhibición de un 34% a pH 7,2 y de un 16% a pH 9,5, mientras que a un pH 7,2 la actividad es mayor que a pH 9,5, a 37°C, pues a una concentración de sustrato 0,05 mM, la inhibición es del 52% (cuadro nº 27) mientras que a una concentración de 0,075 mM es del 50%.

Del estudio cinético se observa una  $V_{m\acute{a}x}$  de 3,0 nmoles/min/mg proteína, a una concentración de sustrato próxima a 0,075 mM, a partir de la cual se inicia la inhibición por sustrato, característica de este enzima que comparte con el de otros sistemas celulares (HAN y JOHNSON, 1982; HERS y HUE, 1983). A 0,25 mM la inhibición es ya del 46% y a 10 mM es del 100%. El valor de  $K_m$  es, aproximadamente, de 7,0  $\mu M$ . La cinética es la típica de un enzima con inhibición por exceso de sustrato (cuadro nº 28 y gráfica nº 25).

Según NIMMO y TIPTON (1982), este enzima, al menos el obtenido de hígado de mamíferos, es muy susceptible a la proteólisis. Este hecho puede valorarse por el cambio de pH óptimo del enzima que pasa de un pH neutro a uno alcalino. De nuestros resultados se desprende

que nuestro procedimiento de obtención es adecuado o que el enzima de T. cruzi es más resistente a la proteólisis que los de hígado de mamíferos.

En otros kinetoplástidos se ha encontrado este enzima pero, en general, ha sido poco estudiado. Así, en extractos crudos de promastigotes de Leishmania braziliensis, L. donovani, L. mexicana y L. tropica, ha sido detectado con una actividad que va de los 3,2 a 13,5 nmoles/min/mg proteína, según la especie (MARTIN y col., 1976), así como en amastigotes y promastigotes de L. donovani en los que MEADE y col. (1984) obtuvieron 0,5 y 7,7 nmoles/min/mg proteína, respectivamente, mientras que en L. m. mexicana, COOMBS y col. (1982), detectaron 6,1 y 11 nmoles/min/mg proteína, respectivamente.

El siguiente enzima clave de la glucólisis, detectado en el citosol de T. cruzi (TAYLOR y col., 1980) es la piruvato kinasa, enzima que produce ATP y piruvato a partir de fosfoenolpiruvato y ADP.

Este enzima ha sido parcialmente purificado en formas epimastigotas de T. cruzi de la cepa Tulahuen, por JUAN y col. (1976). Observaron una curva de saturación sigmoidal para el sustrato fosfoenolpiruvato, en

ausencia de efectores, con un valor para  $S_{0,5}$  de 1,35 mM.

De nuestros resultados se deduce una cinética sigmoideal del enzima para fosfoenolpiruvato, tanto para las formas no infectivas como para las infectivas, obteniendo una  $V_{m\acute{a}x}$  de 39 y 42 nmoles/min/mg prote\u00edna y un valor de  $K_m$  de 0,61 y de 0,41 mM, respectivamente (cuadro n\u00b0 29 y gr\u00e1fica n\u00b0 26).

Seg\u00fan JUAN y col. (1976), este enzima responde a los efectores t\u00edpicos de las piruvato kinasas de otras fuentes. As\u00ed, es activado por D-fructosa-1,6-bisfosfato e inhibido por ATP y AMP, pero en cambio no es afectado por L-alanina (3 mM). El pH \u00f3ptimo es de 6,5 a 30\u00b0C. Requiere  $Mn^{2+}$  o  $Mg^{2+}$  y es activado por  $K^+$  y  $H^+$ . Estos resultados son similares a los obtenidos con piruvato kinasas de tipo hep\u00e1tico de mam\u00edferos.

Los resultados obtenidos con otros tripanosom\u00e1tidos, como C. fasciculata, L. donovani, L. braziliensis (MARR y BERENS, 1977; BERENS y MARR, 1977) y T. brucei (FLYNN y BOWMAN, 1980), permiten concluir que la piruvato kinasa no est\u00e1 sujeta a control alost\u00e9rico en estos protozoos. Esto podr\u00eda estar relacionado con el he-

cho de que la gluconeogénesis no se da en estos organismos, ni almacenan polisacáridos. FLYNN y BOWMAN (1980) suponen que la respuesta sigmoidal del enzima frente al fosfoenolpiruvato puede no tener significado fisiológico "in vivo".

Otros autores han determinado la actividad específica de este enzima en formas epimastigotas, amastigotas y tripomastigotas sanguíneas de T. cruzi. ROGERSON y GUTTERIDGE (1980) trabajando en las condiciones anteriormente mencionadas, obtuvieron 48, 24 y 19 rmoles /min/mg proteína, respectivamente. Mientras tanto, TAYLOR y col. (1980) obtenían 56, 182 y 145 rmoles/min/mg proteína, respectivamente y a las condiciones antes expresadas.

De todo lo anterior podemos comprobar que la fracción de la glucólisis que tiene lugar en el glicosoma funciona a menor velocidad en las formas metacíclicas, mientras que la piruvato kinasa, enzima citosólica tiene una velocidad similar en ambas formas.

De todas maneras, a pesar de estas diferencias no podemos afirmar que éstas influyan grandemente en el metabolismo diferencial de ambas formas, aunque sí puede

mos concluir que la glucólisis funciona en ambas fases del ciclo de vida del parásito.

Por otra parte, la glucosa-6-fosfato puede desviarse hacia la ruta de las pentosas-fosfato por medio del enzima glucosa-6-fosfato deshidrogenasa.

De nuestras experiencias se deduce una  $V_{m\acute{a}x}$  de 139 nmoles/min/mg proteína para los epimastigotes, con una  $K_m$  de 0,21 mM, y de 66 nmoles/min/mg proteína para los metacíclicos, con una  $K_m$  de 0,75 mM, ambas con una curva de saturación hiperbólica para el sustrato.

(cuadro nº 30 y gráfica nº 27 ).

La cinética de este enzima aún no ha sido estudiada en epimastigotes de T. cruzi, pero se ha determinado su actividad específica por diversos autores, como RAW (1959) que obtuvo 41 nmoles/min/mg proteína o STOHLMAN y col. (1973) que obtuvieron 50 ó ROGERSON y GUTTERIDGE (1980) con 169 nmoles/min/mg proteína.

También se ha calculado la actividad específica de este enzima en las formas amastigotas intracelulares y tripomastigotas sanguíneas (135 y 40 nmoles/min/mg proteína, respectivamente) por ROGERSON y GUTTERIDGE



(1980), así como en tripomastigotes obtenidos de cultivo en células Vero (115 nmoles/min/mg proteína) por STOHLMAN y col. (1973).

El estudio más completo realizado sobre este enzima ha sido el de FUNAMAYA y col. (1977) en el que lo purifican parcialmente (unas 15 veces) a partir de formas tripomastigotas metacíclicas de cultivo, purificadas por pase a través de columna de DEAE-celulosa.

La curva de saturación frente a diferentes concentraciones de D-glucosa-6-fosfato y de NADP corresponde a una cinética de tipo hiperbólico, en ambos casos. Sus Km son de 0,3 mM y de 0,087 mM, respectivamente. El pH óptimo es de 8,2.

El enzima es activado por  $Mg^{2+}$  y no modifica su actividad por ATP, ADP, AMP, AMPc ni GTP. NADPH se comporta como inhibidor competitivo para ambos sustratos, mientras que NADH lo hace como inhibidor no competitivo para los mismos. La actividad del enzima es específicamente dependiente de NADP, no dando reacción con NAD.

La actividad específica del enzima en el extracto fue de 16 nmoles/min/mg de proteína, mientras que una vez purificado fue de 240 nmoles/min/mg proteína, a 37°C.

Este enzima parece estar localizado en el citosol de T. cruzi, como la piruvato kinasa, al menos esa es la localización en otros kinetoplástidos como en L. m. mexicana (COOMBS, 1981).

La mayor actividad y menor Km del enzima glucosa-6-fosfato deshidrogenasa de losepimastigotes indica, posiblemente, una mayor incidencia de la vía de las pentosas en estas formas, que según MANCILLA y NAQUIRA, (1964), puede oscilar entre el 30% y el 40% de la glucosa asimilada.

Aunque se ha demostrado la actividad 6-fosfogluconato deshidrogenasa en epimastigotes de T. cruzi, no ha sido demostrada, en cambio, la actividad de otros enzimas de esta ruta, como la transcetolasa ensayada por STOHLMAN y col. (1973) sin éxito en epimastigotes y tripomastigotes de cultivo de células Vero.

RAW (1959) consideró que los niveles de aldolasa encontrados por BAERNSTEIN y REES (1952) en epimastigotes de T. cruzi, eran demasiado bajos para la rápida oxidación de la glucosa por este organismo. El demostró la formación de piruvato a partir de 6-fosfogluconato, pero no a partir de 5-fosforribosa, por lo que sugi

rió que aquél era degradado por el enzima de WOOD y SCHWERDT (1954) originando piruvato y gliceraldehido-3-fosfato. Sin embargo, RYLEY (1962) fue incapaz de demostrar esta escisión en sus experimentos. Por otro lado, ZELEDON (1960b) demuestra que T. cruzi puede oxidar el inhibidor glucolítico 2-desoxiglucosa y concluye que lo hace por el ciclo de las pentosas-fosfato.

Las funciones más importantes de esta ruta en mamíferos es la producción de ribosa-5-fosfato para la generación de ácidos nucleicos, por una parte, y la formación de NADPH para la síntesis de lípidos y para la detoxicación del organismo de agua oxigenada por medio de la glutation-peroxidasa, por otra. Esta actividad no ha sido identificada en T. cruzi (BOVERIS y col., 1980), así como la actividad catalasa, aunque sí la peroxidasa en presencia de ascorbato (BOVERIS y STOPPANI, 1978).

Como las formas infectivas de T. cruzi no se dividen, su requerimiento en ácidos nucleicos, aunque importante, es menor que el de los epimastigotes (FERNANDES y col., 1969) y, por otra parte, la síntesis de lípidos en aquéllas es relativamente baja comparada a las de las formas no infectivas, pues sintetizan lípi-

dos neutros en baja proporción y, según parece, no sin tetizan fosfolípidos (WOOD y SCHILLER, 1975).

MANCILLA y NAQUIRA (1964) relacionan el porcentaje de glucosa metabolizado por esta vía por los epimastigotes con la patogenicidad de las cepas del parásito. En los estudios comparativos realizados aquí con formas metacíclicas y por ROGERSON y GUTTERIDGE (1980) con amastigotes y tripomastigotes sanguíneos, indican que las actividades de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa es mayor que en las otras formas, contradiciendo los resultados de STOHLMAN y col. (1973) que obtienen una actividad mayor en las formas tripomastigotas de cultivo de tejidos que en los epimastigotes. Sin embargo, tanto STOHLMAN y col. (1973) como ROGERSON y GUTTERIDGE (1980) obtienen una actividad 6-fosfogluconato deshidrogenasa mayor en epimastigotes que en las otras formas probadas.

Por todo ello, dudamos de que la relación entre el ciclo de las pentosas-fosfato y la patogenicidad de los tripanosomas exista realmente, ya que las formas sin capacidad infectiva, como son los epimastigotes y amastigotes, son las de mayor actividad glucosa-6-fosfato deshidrogenasa.

Hasta ahora hemos comprobado que, en general, existen diferencias apreciables en el flujo glucolítico entre ambas formas de T. cruzi, tal y como se desprende del estudio realizado con los principales enzimas implicados en el mismo.

Si tenemos en cuenta que ambas formas "in vivo" se desarrollan en entornos cuyo acceso a oxígeno varía significativamente, podríamos explicar dichas diferencias. Mientras que las formas epimastigotas lo hacen en condiciones de una baja presión parcial de  $O_2$ , las formas metacíclicas, al contrario, se desarrollan en un medio mucho más aerobio.

En condiciones anaerobias, las células se ven forzadas a aumentar el flujo glucolítico, para compensar así el menor rendimiento de ATP obtenido por molécula de glucosa. Recuerdese que en estas condiciones se registra solamente la formación neta de dos moléculas de ATP por molécula de glucosa, mientras que la oxidación aerobia completa libera 36 moléculas de este nucleótido por molécula de glucosa. Por tanto, la célula, en condiciones anaerobias, necesita utilizar 18 veces más glucosa a fin de ajustar sus requerimientos energéticos.

La presencia de una mayor cantidad de oxígeno en las formas infectivas, induce la inhibición en la velocidad de consumo de la glucosa, haciendo descender de una forma extraordinaria dicha velocidad. Este fenómeno de inhibición del consumo de glucosa con el consiguiente consumo de oxígeno, se conoce como "efecto Pasteur" (KREBS, 1972).

Desde un punto de vista molecular, la etapa catalizada por la fosfofructokinasa, constituye el punto crucial en la modulación de la velocidad de la glucolisis durante los cambios en las condiciones aerobias y anaerobias.

Además de un proceso de represión enzimática, claramente manifestado en nuestros resultados, existe un efecto claro de inhibición, como discutíamos anteriormente. Las moléculas de ATP, producto de un mayor rendimiento energético en condiciones aerobias, así como la superproducción de citrato e isocitrato, cuya síntesis es más activa en las formas metacíclicas, como se demuestra claramente en los resultados, son capaces de inhibir la actividad de la fosfofructokinasa lo que conduce a una disminución en la velocidad de la glucólisis y, por

tanto, en el suministro de piruvato a las mitocondrias (KREBS, 1972).

Por otra parte, durante la transformación in vitro de las formas de T. cruzi, existe un cambio cuantitativo en los niveles de glucosa. Mientras que las formas epimastigotas crecen en un medio rico en glucosa, los metacíclicos se ven forzados a vivir en un medio de ficiente en glucosa.

Se sabe desde hace tiempo (CRABTREE, 1929 y HOMMES, 1965) que células crecidas en altas concentraciones de glucosa inducen un metabolismo anaerobio, mientras que cuando crecen en bajas concentraciones de este azúcar, desarrollan un metabolismo francamente aerobio. Este fenómeno de cambio metabólico inducido por las propias concentraciones de glucosa, se conoce con el nombre de "efecto Crabtree".

Ambos efectos discutidos, tanto in vivo como in vitro, ayudan a comprender el comportamiento cualitativamente diferente que presentan las formas epimastigotas y metacíclicas respecto a la utilización de la glucosa.

Una vez que la glucosa ha sido convertida en

piruvato por la vía glucolítica, parte de éste se integra en el ciclo de Krebs, que tiene lugar en el interior de la mitocondria, en forma de acetil-Co A, el cual se une al oxalacetato para formar, en colaboración con el enzima citrato sintasa, el ácido cítrico.

Esta actividad fue detectada en las formas epimastigotas de T. cruzi por JUAN y col. (1977) y el enzima parcialmente purificado (unas 3 veces) fue utilizado para los ensayos cinéticos, obteniendo una actividad específica de 45 nmoles/min/mg proteína. ADP y ATP actuaron como inhibidores competitivos frente acetil-Co A y no competitivos frente oxalacetato. Este enzima mostró una Km para el oxalacetato de 2,6  $\mu\text{M}$  y para el acetil-Co A de 5,5  $\mu\text{M}$ , no siendo afectado, el enzima, por NADH ni por alfa-cetoglutarato. Concluyen que esta citrato sintasa es similar al de otras eucariotas.

Nosotros hemos obtenido una velocidad máxima de 25 nmoles/min/mg proteína, a 0,3 mM de acetil-Co A, y de 23 nmoles/min/mg proteína, a 0,5 mM de oxalacetato, para los epimastigotes y de 253 y 282, para los metacíclicos, respectivamente. Los primeros ostentan una Km de 4,9  $\mu\text{M}$  para el acetil-Co A y de 4,6  $\mu\text{M}$  para oxalace-



tato, mientras que para los segundos es de 3,6 y 4,1  $\mu\text{M}$ , respectivamente. La cinética es hiperbólica en todos los casos. (cuadros nº 31 y 32, gráficas nº 28, 29, 30 y 31).

ROGERSON y GUTTERIDGE (1980) obtuvieron una actividad específica de 43 nmoles/min/mg proteína para los epimastigotes a 28°C, mientras que para amastigotes y tripomastigotes sanguíneos, a 37°C, fue de 12 y 11, respectivamente, en T. cruzi.

Según OCHOA (1955), este enzima está presente en las concentraciones más altas en tejidos con un alto metabolismo aerobio, como el del músculo del pecho de paloma o el de corazón. De ello podemos deducir que las formas metacíclicas tendrán un metabolismo bastante más aerobio que el de las epimastigotas y, teniendo en cuenta su habitat natural, es lógico, ya que los segundos viven en el intestino del redúvido vector mientras que los primeros habitan en el recto, es decir, próximos a un orificio que contacta con el exterior, lo que permite un mayor intercambio gaseoso.

Esto viene confirmado por los datos obtenidos tanto para la actividad isocitrato deshidrogenasa dependiente de NADP como para succinato deshidrogenasa, ambas

bastante más activas en las formas metacíclicas que en las epimastigotas, expresada la actividad por mg de proteína.

Nuestros resultados indican una actividad específica de 102 nmoles/min/mg proteína y una Km de 31  $\mu\text{M}$  para los epimastigotes y de 204 y 16, respectivamente, para los metatripomastigotes, siendo la cinética hiperbólica en ambos casos (cuadro nº 33 y gráfica nº 32).

STOHLMAN y col. (1973) obtienen una actividad específica, en extractos de T. cruzi centrifugados a 30000 x g, de 137 y 58 nmoles/min/mg proteína para los epimastigotes y tripomastigotes procedentes de células Vero, respectivamente. No observaron efectos negativos al reemplazar el ión  $\text{Mn}^{2+}$  por el  $\text{Mg}^{2+}$ .

Previamente, RAW (1959) había obtenido, para un extracto de epimastigotes de T. cruzi, una actividad de 15 nmoles/min/mg proteína.

Hemos intentado detectar, tanto en unas formas como en las otras, actividad isocitrato deshidrogenasa dependiente de NAD sin conseguir resultados positivos. Estos mismos resultados han sido obtenidos por otros autores para las formas epimastigotas (AGOSIN y WEINBACH,

1956; RAW, 1959; ROGERSON y GUTTERIDGE, 1980), amastigotas y tripomastigotas sanguíneas (ROGERSON y GUTTERIDGE, 1980). En otros tripanosomátidos, como distintas especies de Leishmania (MARTIN y col., 1976), tampoco se ha detectado esta actividad, al igual que en otros parásitos helmintos, como Fasciola hepatica (PRICHARD y SCHOFIELD, 1968), Ascaris lumbricoides (OYA y col., 1965) o Trichinella spiralis (GOLDBERG, 1957).

La última actividad enzimática estudiada del ciclo de los ácidos tricarbóxicos se integra en la fase reductora del ciclo. Es la succinato deshidrogenasa, enzima ligado a la membrana mitocondrial.

Los resultados obtenidos por nosotros muestran que las formas epimastigotas tienen, aproximadamente, 3 veces más proteína insoluble que las formas metacíclicas. Así, cuando la  $V_{máx}$  para las primeras es de 8,07 nmoles/min/mg proteína (0,85 nmoles/min/mg de peso húmedo) con una  $K_m$  de 0,41 mM (0,40 mM), para las segundas es de 38,34 nmoles/min/mg proteína (1,18 nmoles/min/mg de peso húmedo) con una  $K_m$  de 0,67 mM (0,61 mM). La cinética, en ambas formas, es de tipo hiperbólico (cuadros nº 34 y 35, gráficas nº 33 y 34).

Es interesante indicar que cuando utilizamos tritón X-100 al 0,1% para solubilizar el enzima, éste perdió su actividad, probablemente debido a que el contorno químico de la membrana mitocondrial es necesario para su actividad.

AGOSIN y Von BRAND (1955) calcularon la temperatura óptima de acción de la succinato deshidrogenasa de epimastigotes de T. cruzi, siendo de 37°C, y el pH óptimo osciló entre 8,0 y 9,0. La concentración saturante de sustrato (succinato) fue de 7,5 mM. La mayor parte de la actividad se detecta en las fracciones mitocondrial y microsomal.

De MEIRELLES y SOUZA (1982) detectan citoquímicamente las actividades isocitrato deshidrogenasa NADP-dependiente y succinato deshidrogenasa en formas intra- y extracelulares en cultivos de tejidos infectados con formas sanguíneas de T. cruzi, localizándolas en la membrana interna y crestas mitocondriales.

La parte oxidativa del ciclo de Krebs es examinada con el estudio de las actividades citrato sintasa e isocitrato deshidrogenasa dependiente de NADP. La actividad de estos dos enzimas es muy superior en las formas

metacíclicas, lo que indica un metabolismo oxidativo más prnunciado que el de los epimastigotes. Esto no se observa al medir la producción de  $^{14}\text{CO}_2$  a partir de D-(U- $^{14}\text{C}$ )-glucosa, probablemente debido a que la glucolisis y/o el transporte de glucosa a través de la membrana celular actuan como factores limitantes en la velocidad de oxidación de la misma.

Si tenemos en cuenta que la glucolisis actua a velocidad limitada y que las formas metacíclicas habitan en medios pobres en monosacáridos combustibles, el ciclo de Krebs debe funcionar tan activamente para la obtención de energía a partir de lípidos y/o proteínas.

Las formas metacíclicas son capaces de convertir parte de los ácidos grasos a  $\text{CO}_2$  en una proporción mucho mayor que los epimastigotes (48 veces, en el caso del palmitato) (WOOD, 1975; WOOD y SCHILLER, 1975). ROGERSON y GUTTERIDGE (1980) comprobaron que también las formas sanguíneas y las intracelulares eran capaces de generar  $\text{CO}_2$  a partir de palmitato, en una proporción de 10 y 20 veces mayor que los epimastigotes, respectivamente.

Pero aún así, el estímulo de la respiración endógena, en las formas epimastigotas, amastigotas y sanu

guíneas de T. cruzi, originado por los ácidos grasos palmitato y estearato, fue prácticamente nulo comparado con el producido por la glucosa (26%, 18% y 14%, respectivamente) o por distintos aminoácidos, como histidina (21%, 21% y 27%), glutamina (23%, 30% y 19%) o glutamato (15%, 18% y 28%).

De todo ello se deduce que cuando Trypanosoma cruzi carece de monosacáridos para la obtención de energía, probablemente utiliza aminoácidos libres u obtenidos por hidrólisis de la proteínas, por acción de las proteasas (ITOW y CAMARGO, 1977; BONTEMPI y col., 1984).

Debido a su activa glutamato deshidrogenasa dependiente de NAD(P)H es posible pensar que esta sea una vía de entrada de aminoácidos al ciclo de Krebs en forma de alfa-cetoglutarato, aunque la elevada actividad citrato sintasa e isocitrato deshidrogenasa NADP-dependiente sugieren que serían los aminoácidos que entraran a nivel de oxal-acetato y/o acetyl-coenzima A, los que serían preferentemente consumidos por los metatrimastigotes de este parásito, aunque los resultados obtenidos con Ser, Ala y Thr (SYLVESTER y KRASSNER, 1976; ROGERSON y GUTTERIDGE, 1980) en epimastigotes no avalan esta hipótesis, pero ello no indica que se pueda descartar en

metacíclicos o que se pueda producir con otros aminoácidos, pues como observamos de las medidas de amonio realizadas en los cultivos destinados a la obtención de formas metacíclicas, la producción del mismo es elevada, sobre todo cuando se agota la glucosa del medio (cuadro nº 22 y gráfica nº 21).

De todas formas, se supone que las sustancias de reserva que sostienen una respiración endógena relativamente alta en este hemoflagelado son proteínas y/o triglicéridos, ya que no han podido ser detectados polisacáridos del tipo del glucógeno (RYLEY, 1956; ROGERSON y GUTTERIDGE, 1980), pero se ha comprobado una reducción de los niveles de triglicéridos de estos protozoos durante el ayuno, con aumento de los ácidos grasos libres (ROITMAN y GUTTERIDGE, en ROGERSON y GUTTERIDGE, 1980), así como un desprendimiento de amoníaco y ácidos volátiles (RYLEY, 1956).

6.- CONCLUSIONES



- 1.- De nuestros resultados experimentales se deduce que la adición de cloruro sódico al medio de cultivo generando una presión osmótica comprendida entre 475 y 575 mOsmol/kg, no influye en el crecimiento de las formas epimastigotas de Trypanosoma cruzi, pero favorece de una manera significativa la metaciclogénesis de dicho protozoo.
- 2.- Cuando el incremento de la presión osmótica se realizó con sustancias no electrolitos, no se alteraron los niveles de metaciclogénesis con respecto a los controles, lo que parece indicar que la presión osmótica, por sí sola, no es un factor desencadenante de dicha transformación en este protozoo.
- 3.- La acidificación o basificación del medio Grace previa a su neutralización, así como el tiempo de acción de la misma, no influyen en los niveles de crecimiento y diferenciación de Trypanosoma cruzi.
- 4.- En los extractos de Rhodnius prolixus se aprecia una desaparición rápida de la tiamina del medio de ensayo, lo que sugiere que existe, en la chinche

triatómida, un factor tiaminolítico o captador de dicha vitamina, reduciendo así los niveles de tiamina en los medios de cultivo adicionados de extractos de redúvidos, en los que se observa un incremento notable de la metaciclologénesis.

- 5.- De nuestros resultados experimentales se deduce que el ácido fólico, D-pantotenato cálcico, tiamina y riboflavina, son necesarios para el crecimiento de Trypanosoma cruzi in vitro.
- 6.- La ausencia de las vitaminas ensayadas, excepto D-pantotenato cálcico, influyen de una manera negativa en los niveles de metaciclologénesis.
- 7.- La ausencia de ácidos orgánicos en el medio de cultivo favorece de manera significativa los niveles de crecimiento, aunque no modifica los niveles de transformación, a diferencia de lo manifestado por otros autores.
- 8.- La ausencia de los aminoácidos serina, asparragina, glutamina, arginina, treonina y triptófano del medio

de cultivo reduce significativamente los niveles de crecimiento de este parásito, aunque al cabo de 35 días se siguen observando protozoos viables en dichos medios.

- 9.- La eliminación de los monosacáridos, glucosa y fructosa, de los medios de cultivo, modifica significativamente los niveles de crecimiento de este flagelado, incrementando igualmente los de diferenciación

Por todo ello, consideramos que el proceso de metaciclogénesis es multifactorial, que debe estar influenciado por una serie de factores físico-químicos como la concentración de los iones sodio del medio de cultivo, la ausencia de sustratos monosacáridos junto con unos niveles óptimos de aminoácidos y vitaminas, necesarios para soportar el crecimiento del parásito. No es descartable la existencia de factores intrínsecos del insecto redúvido (enzimas, lectinas, ...).

- 10.- Todas las formas estudiadas de Trypanosoma cruzi son capaces de producir, en su catabolismo normal, grandes cantidades de amonio que hacen que, en los medios

de cultivo para la transformación de formas epimastigotas a metacíclicas, precipite como sal insoluble del mismo, bajo la forma de estruvita (fosfato doble de amonio y magnesio hexahidratado).

- 11.- Ambas formas de Trypanosoma cruzi, epimastigotas y metacíclicas, presentan un flujo glucolítico activo, tal y como se demuestra por la presencia de las actividades enzimáticas claves de este proceso. No obstante, se observan diferencias cualitativas y cuantitativas importantes entre ambas.

Los epimastigotes muestran una mayor velocidad glucolítica que los metacíclicos, lo que está de acuerdo con una mayor concentración celular de los enzimas hexokinasa y fosfofructokinasa. Teniendo en cuenta este hecho junto con sus velocidades iniciales a concentraciones de sustrato celulares así como la constante de equilibrio de las mismas, se introduciría un factor teórico de aceleración de unas 300 veces en el flujo de utilización de glucosa por los epimastigotes.

- 12.- Teniendo en cuenta los resultados obtenidos bajo nuestras condiciones experimentales, aproximadamen

te los 2/3 de la glucosa "atrapada" por la actividad hexokinasa en los epimastigotes es derivada hacia el ciclo de las pentosas-fosfato, gracias a la actividad glucosa-6-fosfato deshidrogenasa mostrada por los mismos. En cuanto a los metacíclicos, sólo 1/4 de la glucosa-6-fosfato es dirigida hacia la formación de 6-fosfogluconato.

13.- Por primera vez, se ha detectado actividad fructosa-1,6-bisfosfatasa en las diferentes formas estudiadas de T.cruzi, lo que pone de manifiesto la existencia de una actividad gluconeogénica por parte de este parásito. El comportamiento cinético de este enzima es semejante al que presenta en otros sistemas biológicos. La actividad del enzima se ve claramente inhibida por el pH y la temperatura. La velocidad máxima de la fructosa-1,6-bisfosfatasa, que es aproximadamente el doble en epimastigotes que en metacíclicos, se alcanza a una concentración de fructosa-1,6-bisfosfato cercana a 0,1 mM.

14.- El comportamiento enzimático de epimastigotes y metacíclicos cambia cuando se analizan las actividades de los enzimas implicados en la última fase del catabo-

lismo celular. Los metatripomastigotes de este protozoo presentan una mayor actividad de los enzimas citrato sintasa, isocitrato deshidrogenasa dependiente de  $\text{NADP}^+$  y succinato deshidrogenasa que las formas epimastigotas. Este cambio cualitativo y cuantitativo, constituye un perfecto ejemplo de integración entre la fase glucolítica y la posterior oxidación aerobia del esqueleto carbonado, para el mantenimiento de un estado energético óptimo para la célula.

- 15.- En nuestras condiciones experimentales, no se ha detectado actividad isocitrato deshidrogenasa ligada a  $\text{NAD}^+$  en ninguna de las formas de T. cruzi estudiadas.
- 16.- Finalmente, y teniendo en cuenta los aspectos estudiados en la presente Memoria, podemos concluir que el comportamiento molecular y bioquímico de las distintas formas de Trypanosoma cruzi está de acuerdo con aquél fisiológico que las caracteriza.

Las formas epimastigotas viven en un medio relativamente pobre en oxígeno y, por tanto, necesitan desarrollar un fuerte flujo glucolítico, con el objeto de mantener su correspondiente estado energético celular. Por otra parte, se trata de formas que

se dividen muy activamente, lo que significa la necesidad de una síntesis activa de ácidos nucleicos. Por esta razón, gran parte de la glucosa utilizada es dirigida, en estas formas, hacia la síntesis de ribosa-5-fosfato.

Por lo que respecta a las formas metacíclicas, que se localizan en medios más ricos en oxígeno aunque más pobres en glucosa, obtienen la energía necesaria, para su extraordinaria movilidad y capacidad infectiva, desarrollando un metabolismo oxidativo activo, tanto de la glucosa como de otros combustibles metabólicos a su alcance.

## CONCLUSION GENERAL

Dentro del carácter multifactorial intrínseco al proceso de transformación de epimastigotes en metacíclicos, sobresale la necesidad de una reducción significativa en los niveles de monosacáridos glucosa y fructosa. Este hecho condiciona que las nuevas formas generadas, responsables de la infección directa del hospedador mamífero, utilicen otros combustibles energéticos para llevar a cabo su actividad celular. En este sentido, se puede concluir que dichas formas emplean preferentemente los aminoácidos procedentes del metabolismo proteico, como se desprende del enorme incremento en la producción de amonio que se induce en la metaciclogénesis.

Todo ello explica claramente la dualidad metabólica encontrada entre ambas formas de Trypanosoma cruzi: La existencia de un elevado flujo glucolítico durante el crecimiento de epimastigotes frente a un activo metabolismo del ciclo de los ácidos tricarbónicos de los metacíclicos, consecuencia de un aumento en la actividad de los enzimas implicados así como de un mayor aporte de intermediarios del ciclo, procedentes del catabolismo proteico.



7.- BIBLIOGRAFIA

AGOSIN, M.; NAQUIRA, C.; CAPDEVILA, J.; PAULIN, J.; 1976a  
Hemoproteins in Trypanosoma cruzi with emphasis on mi-  
croosomal pigments.

Int. J. Biochem., 7: 585-594.

AGOSIN, M.; NAQUIRA, C.; PAULIN, J.; CAPDEVILA, J.; 1976b  
Cytochrome P-450 and drug metabolism in Trypanosoma cru-  
zi: Effects of phenobarbital.

Science, 194 (4261): 195-197.

AGOSIN, M.; Von BRAND, T.; 1955

Characterization and intracellular distribution of the  
succinic dehydrogenase of Trypanosoma cruzi.

Exp. Parasitol., 4: 548-563.

AGOSIN, M.; WEINBACH, E.C.; 1956

Partial purification and characterization of the isoci-  
tric dehydrogenase from Trypanosoma cruzi.

Biochim. et Biophys. Acta, 21: 117-126.

ALMEIDA, D.F.; SOUZA, W. De; 1978

Morphological changes of Herpetomonas samuelpeessoai.

J. Parasitol., 64: 17-22.

ALVARENGA, N.J.; BRENER, Z.; 1978

Development of Trypanosoma cruzi in the vector in the absence of blood.

Acta Trop., 35: 315-317.

ALVARENGA, N.J.; ZELEDON, R.; MOSEE, R.A.; SOARES, V.A.;  
1976

Effect of temperature on the metacyclogenesis of Trypanosoma cruzi.

IV Congr. Lat. Amer. Parasitol., San José de Costa Rica.

ANGLUSTER, J.; BUNN, M.M.; SOUZA, W. De; 1977

Effect of 2-deoxy-D-glucose on differentiation of Herpetomonas samuelpessoai.

J. Parasitol., 63: 922-924.

ARMSTRONG, J.A.; HART, P.D.; 1971

Response of cultures macrophages to Mycobacterium tuberculosis with observations in fusion of lysosomes with phagosomes.

J. Exp. Med., 134: 713-717.

ASTOLFI FILHO, S.; De SA, M.F.G.; GANDER, E.S.; 1984

Protein synthesis in purified trypano- and epimastigote

forms of Trypanosoma cruzi.

Acta Trop., 41: 109-115.

AVILA, J.L.; AVILA, A.; 1981

Trypanosoma cruzi: Nucleotide and vitamin requirements of growing epimastigotes.

Exp. Parasitol., 51: 318-324.

AVILA, J.L.; BRETANA, A.; CASANOVA, M.A.; AVILA, A.; RODRIGUEZ, F.; 1979a

Trypanosoma cruzi: Defined medium for continuous cultivation of virulent parasites.

Exp. Parasitol., 48: 27-35.

AVILA, J.L.; CASANOVA, M.A.; AVILA, A.; BRETANA, A.; 1979b

Acid and neutral hidrolases in Trypanosoma cruzi. Characterization and assay.

J. Protozool., 26: 304-311.

AZEVEDO, H.P.De; ROITMAN, I.; 1977

Growth of the Y strain Trypanosoma cruzi in an HX25-modified defined medium.

J. Parasitol., 63: 485.

BACCHI, C.J.; VERGARA, C.; GAROFALO, J.; 1978

Incorporation of  $^3\text{H}$ -ornithine and  $^{14}\text{C}$ -methionine into polyamines trypanosomatids.

J. Protozool., 23: 154-158.

BAERNSTEIN, H.D.; 1953a

Malic dehydrogenase and related enzymes in the culture form of Trypanosoma cruzi.

Exp. Parasitol., 2: 380-396.

BAERNSTEIN, H.D.; 1953b

The enzyme systems of the culture form of Trypanosoma cruzi.

Ann. N. Y. Acad. Sci., 56: 982-994.

BAERNSTEIN, H.D.; REES, C.W.; 1952

Aldolase in the culture form of Trypanosoma cruzi.

Exp. Parasitol., 1: 215-228.

BAKER, J.R.; 1966

Studies on Trypanosoma avium. IV. The development of infective metacyclic trypanosomes in cultures grown in vitro.

Parasitol., 56: 15-19.

BARRETT, T.V.; 1976

Parasites and predators of Triatominae.

En: "American Trypanosomiasis Research", Sc. Pub. No. 318, pp. 24-32, P.A.H.O., Washington.

BARROS, E.G.; CALDAS, R.A.; 1983

Partial purification and characterization of glutamic pyruvic transaminase from Trypanosoma cruzi.

Comp. Biochem. Physiol., 74B: 449-452.

BAUMANN, P.; WRIGHT, B.E.; 1968

The phosphofructokinase of Dictyostelium discoideum.

Biochem., 7: 3653-3661.

BEAVON, J.; HEATLEY, N.G.; 1962

The occurrence of struvite (magnesium ammonium phosphate hexahydrate) in microbial cultures.

J. Gen. Microbiol., 31: 167-169.

BERENS, R.L.; MARR, J.J.; 1977a

Phosphofructokinase of Leishmania donovani and Leishmania brasiliensis and its role in a glycolysis.

J. Protozool., 24: 340-344.

BERENS, R.L.; MARR, J.J.; 1977b

Leishmania donovani and Leishmania braziliensis: function of pyruvate kinase.

Exp. Parasitol., 43: 407-413.

BERGMEYER, H.U.; BERNT, E.; 1974

D-glucose: Determination with glucose oxidase and peroxidase.

En: "Methods of enzymatic analysis", H.U. Bergmeyer (ed) pp. 1205-1215, Verlag-Chemie Academic Press, New York.

BERRY, L.G.; 1974

Selected powder diffraction data for minerals: data book  
Published by the Joint Committee on Powder Diffraction  
Standards. Philadelphia.

BILLY, C.; BLANC, Ph.; ROUVILLOIS, A.; 1976

Synthèse d'aragonite en milieu marin par voie bactérienne.  
Ann. Inst. Océanogr., Paris, 52: 231-239.

BLACK, M.; 1933

The precipitation of calcium carbonate on the great Bahama Bank.

Geol. Mag., 70: 455-466.

BLANGY, D.; BUC, H.; MONOD, J.; 1967

Kinetics of the allosteric interactions of phosphofructokinase from Escherichia coli.

J. Mol. Biol., 31: 13-35.

BOKER, C.A.; SCHAUB, G.A.; 1984

Scanning electron microscopic studies of Trypanosoma cruzi in the rectum of its vector Triatoma infestans.

Z. Parasitenkd., 70: 459-469.

BONE, G.J.; PARENT, G.; 1963

Stearic acid, an essential growth factor for Trypanosoma cruzi.

J. Gen. Microbiol., 31: 261-266.

BONNER, W.D.; 1955

Succinic dehydrogenase.

En: "Methods in enzymology", S.P. Colowick y N.O. Kaplan (eds), 1, pp. 722-725, Academic Press, New York.

BONTEMPI, E.; FRANKE De CAZZULO, B.M.; RUIZ, A.M.; CAZZULO, J.J.; 1984

Purification and some properties of an acidic protease from epimastigotes of Trypanosoma cruzi.

Comp. Biochem. Physiol., 77B: 599-604.



BOQUET, E.; BORONAT, A.; RAMOS-CORMENZANA, A.; 1973  
Production of calcite (calcium carbonate) crystals by  
soil bacteria is a general phenomenon.  
Nature, 246: 527-529.

BOVERIS, A.; SIES, H.; MARTINO, E.E.; DOCAMPO, R.; TU-  
RRENS, J.F.; STOPPANI, A.O.M.; 1980  
Deficient metabolic utilisation of hydrogen peroxide in  
Trypanosoma cruzi.  
Biochem. J., 188: 643-648.

BOVERIS, A.; STOPPANI, A.O.M.; 1978  
Metabolismo del peróxido de hidrógeno en Trypanosoma  
cruzi.  
Medicina (Buenos Aires), 38: 259-265.

BOWMAN, I.B.R.; 1974  
Intermediary metabolism of pathogenic flagellates.  
En: "Trypanosomiasis and Leishmaniasis with special re-  
ference to Chagas' disease", Ciba Foundation Symposium,  
20 (New series), pp. 255-271, Associated Scientific  
Publishers, Amsterdam.

BOWMAN, I.B.R.; TOBIE, E.J.; Von BRAND, T.; 1963

CO<sub>2</sub> fixation studies with the culture form of Trypanosoma cruzi.

Comp. Biochem. Physiol., 9: 105-114.

BRACK, C.; 1968

Elektronenmikroskopische untersuchungen zum lebenszyklus von Trypanosoma cruzi. Unter besonderer berücksichtigung der entwicklungsformen im uberträger Rhodnius prolixus.

Acta Trop., 25: 289-356.

BRENER, Z.; 1969

The behaviour of slender and stout forms of Trypanosoma cruzi in the bloodstream of normal and immune mice.

Ann. Trop. Med. Parasitol., 63: 215-220.

BRENER, Z.; 1973

Biology of Trypanosoma cruzi.

Ann. Rev. Microbiol., 27: 347-382.

BRENER, Z.; 1979

Present status of chemotherapy and chemoprophylaxis of human trypanosomiasis in the western hemisphere.

Pharmacol. Ther., 7: 71-90.

BRENER, Z.; ALVARENGA, N.J.; 1976

Life cycle of T. cruzi in the vector.

En: "American Trypanosomiasis Research", Sci. Pub. No. 318, pp. 83-86. P.A.H.O., Washington.

BROOKER, B.E.; VICKERMAN, K.; 1964

Acid phosphatase in Trypanosomes.

Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg., 58: 293-294.

BRUMPT, A.J.E.; 1912

Le Trypanosoma cruzi evolue chez Conorhinus megistus, Cimex lectularis et Ornithodoros moubata. Cycle evolutif de ce parasite.

Bull. Soc. Path. Exot., 5: 360-364.

(Citado por KATZ y col., 1982).

BRUN, R.; SCHONENBERGER, M.; 1981

Stimulating effect of citrate and cis-aconitate on the transformation of Trypanosoma brucei bloodstream forms to procyclic forms in vitro.

Z. Parasitenkd., 66: 17-24.

CACERES, O.; FERNANDES, J.F.; 1976

Glucose metabolism, growth and differentiation of Try-

panosoma cruzi.

Rev. Brasil. Biol., 36: 397-410.

CALDAS, R.A.; ARAUJO, E.F.; FELIX, C.R.; ROITMAN, I.; 1980  
Incorporation of ammonium in amino acids by Trypanosoma  
cruzi.

Parasitol., 66: 213-216.

CAMARGO, E.P.; 1964

Growth and differentiation in Trypanosoma cruzi. I. Origin  
of metacyclic trypanosomes in liquid media.

Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo, 6: 93-100.

CANNATA, J.J.B.; CAZZULO, J.J.; 1984a

Glycosomal and mitochondrial malate dehydrogenases in epi-  
mastigotes of Trypanosoma cruzi.

Mol. Biochem. Parasitol., 11: 37-49.

CANNATA, J.J.B.; CAZZULO, J.J.; 1984b

The aerobic fermentation of glucose by Trypanosoma cruzi.

Comp. Biochem. Physiol., 79B: 297-308.

CANNATA, J.J.B.; DOCAMPO, R.; VALLE, E.; FRANKE DE CAZZU-  
LO, B.M.; CAZZULO, J.J.; 1980

Distribución intracelular de las enzimas fijadoras de CO<sub>2</sub> en Trypanosoma cruzi y Crithidia fasciculata.

Medicina (Buenos Aires), 40: 145-153.

CANNATA, J.J.; FRASCH, A.A.C.; CATALDI De FLOMBAUM, M.A.  
SEGURA, E.L.; CAZZULO, J.J.; 1979

Two forms of malic enzyme with different regulatory properties in Trypanosoma cruzi.

Biochem. J., 184: 409-419.

CANNATA, J.J.B.; VALLE, E.; DOCAMPO, R.; CAZZULO, J.J.;  
1982

Subcellular localization of phosphoenolpyruvate carboxykinase in the trypanosomatids Trypanosoma cruzi and Crithidia fasciculata.

Mol. Biochem. Parasitol., 6: 151-160.

CARNEIRO, V.T.C.; CALDAS, R.A.; 1983

Regulatory studies of L-glutamate dehydrogenase from Trypanosoma cruzi epimastigotes.

Comp. Biochem. Physiol., 75B: 61-64.

CASTELLANI, O.; RIBEIRO, L.V.; FERNANDES, J.F.; 1967

Differentiation of Trypanosoma cruzi in culture.

J. Protozool., 14: 447-451.

CATALDI De FLOMBAUM, M.A.; CANNATA, J.J.B.; CAZZULO, J.  
J.; SEGURA, E.L.; 1977

CO<sub>2</sub>-Fixing enzymes in Trypanosoma cruzi.

Comp. Biochem. Physiol., 58B: 67-69.

CATALDI De FLOMBAUM, M.A.; FRASCH, A.C.C.; STOPPANI, A.  
O.M.; 1980

Adenosine triphosphatasa from Trypanosoma cruzi; purifi-  
cation and properties.

Comp. Biochem. Physiol., 65B: 103-110.

CAVANAGH, P.; MARSDEN, P.D.; 1969

Bacteria isolated from the gut of some reduviid bugs.

Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg., 63: 415-416.

CAZZULO, J.J.; 1978

La degradación aeróbica de la glucosa por Trypanosoma  
cruzi.

Medicina (Buenos Aires), 38: 53-59.

CAZZULO, J.J.; 1984

Protein and amino acid catabolism in Trypanosoma cruzi.

Comp. Biochem. Physiol., 79B: 309-320.

CAZZULO, J.J.; FRANKE De CAZZULO, B.M.; HIGA, A.I.; SEGURA, E.L.; 1979

NAD-linked glutamate dehydrogenase in Trypanosoma cruzi.  
Comp. Biochem. Physiol., 64B: 129-133.

CAZZULO, J.J.; FRANKE De CAZZULO, B.M.; SEGURA, E.L.;  
1980a

Inhibition of the NAD-linked glutamate dehydrogenase from  
Trypanosoma cruzi by sulphhydryl reagents.

Comp. Biochem. Physiol., 67B: 163-170.

CAZZULO, J.J.; JUAN, S.M.; SEGURA, E.L.; 1977a

The malic enzyme from Trypanosoma cruzi.

J. Gen. Microbiol., 99: 237-241.

CAZZULO, J.J.; JUAN, S.M.; SEGURA, E.L.; 1977b

Glutamate dehydrogenase and aspartate aminotransferase  
in Trypanosoma cruzi.

Comp. Biochem. Physiol., 56B: 301-303.

CAZZULO, J.J.; VALLE, E.; DOCAMPO, R.; CANNATA, J.J.B.;  
1980b

Intracellular distribution of carbon dioxide-fixing enzymes in Trypanosoma cruzi and Crithidia fasciculata.

J. Gen. Microbiol., 117: 271-274.

CITRI, M.; 1954

Cultivation of haemoflagellates under defined conditions and analysis of the growth requirements of Trypanosoma cruzi.

Thesis, Hebrew University, Jerusalem.

(Citado por Avila y Avila, 1981.).

CITRI, N.; GROSSOWICZ, N.; 1955

A partially defined culture medium for Trypanosoma cruzi and some others haemoflagellates.

J. Gen. Microbiol., 13: 273-278.

CLARK, T.B.; 1959

Comparative morphology of four genera of Trypanosomatidae.

J. Protozool., 6: 227-232.

CLEVELAND, L.R.; 1959

Sex induced with ecdysone.

Proc. Nat. Acad. Sci., 45: 747-753.

CONTRERAS, V.T.; MOREL, C.M.; GOLDENBERG, S.; 1985

Stage-specific gene expression precedes morphological changes during Trypanosoma cruzi metacyclogenesis.

Mol. Biochem. Parasitol., 14: 83-96.



COOMBS, G.H.; 1981

En: KLEIN, R.A.; MILLER, P.G.G. Alternate metabolic pathways in protozoan energy metabolism.

Parasitol., 82: 1-30.

COOMBS, G.H.; CRAFT, J.A.; HART, D.T.; 1982

A comparative study of Leishmania mexicana amastigotes and promastigotes. Enzyme activities and subcellular locations.

Mol. Biochem. Parasitol., 5: 199-211.

CORONEL, C.; GEREZ De BURGOS, N.M.; BURGOS, C.; BLANCO, A.; 1980

Separación y propiedades catalíticas de isoenzimas de alfa-hidroxiácido deshidrogenasa de Trypanosoma cruzi.

Medicina (Buenos Aires), 40: 159-164.

COX, F.E.G.; 1982

Trypanosoma cruzi: Signals for transformation.

Nature, 300: 685.

CRANE, M.S.J.; DVORAK, J.A.; 1982

Trypanosoma cruzi: Spontaneous transformation by a Y strain variant in liquid medium.

Exp. Parasitol., 54: 87-92.

CROSS, G.A.M.; KLEIN, R.A.; BAKER, J.R.; 1975a

Trypanosoma cruzi: growth, amino acid utilization and drug action in a defined medium.

Ann. Trop. Med. Parasitol., 69: 513-514.

CROSS, G.A.M.; KLEIN, R.A.; LINSTEAD, D.J.; 1975b

Utilization of amino acids by Trypanosoma brucei in culture: L-threonine as a precursor for acetate.

Parasitol., 71: 311-326.

CROSS, G.A.M.; MANNING, J.C.; 1973

Cultivation of T. brucei spp. in semi-defined and defined medium.

Parasitol., 67: 315-331.

CHAGAS, C.; 1909

Nova tripanosomiase human. Estudos sôbre a morfologia eo ciclo evolutivo de Schizotrypanum cruzi n. gen. n. sp. agente etiolojico de nova entidade morbida do homem.

Mem. Inst. Oswaldo Cruz, 1: 159-218.

CHAGAS, C.; 1911

Nova entidade morbida do homem; resumo geral de estudos etiolóxicos e clínicos.

Mem. Inst. Oswaldo Cruz, 3: 219-275.

(citado por HOARE, 1972).

CHANG, S.L.; 1948

Studies on haemoflagellates. IV. Observations concerning some biochemical activities in culture and respiration of three species of Leishmania and Trypanosoma cruzi.

J. Infect. Dis., 82: 109-118.

CHIARI, E.; 1974

Growth and differentiation of Trypanosoma cruzi culture forms kept in laboratory for different periods of time.

Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo, 16: 81-87.

CHIARI, E.; 1976

Differentiation of Trypanosoma cruzi in culture.

En: "American Trypanosomiasis Research", Sci. Pub. No. 318, pp. 144-145, P.A.H.O., Washington.

CHIARI, E.; CARNEIRO, M.; 1978a

Stimulatory effects of extracts of Hemiptera on the transformation from epimastigotes to tripomastigotes, in Trypanosoma cruzi.

Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo, 20: 234.

CHIARI, E.; CARNEIRO, M.; 1978b

Factors acting on stimulation of differentiation epimastigotes-tripomastigotes of Trypanosoma cruzi.

Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo, 20: 234.

DEANE, M.P.; KIRCHNER, E.; 1963

Life cycle of Trypanosoma conorrhini. Influence of temperature and other factors on growth and morphogenesis.

J. Protozool., 10: 391-399.

De BOISO, J.F.; 1983

Consumo de glucosa y su relación con la acidificación del medio durante el crecimiento del Trypanosoma cruzi.

III Jornadas Científicas, Facultad de Farmacia, Universidad Central de Venezuela, Caracas.

De BOISO, J.F.; DOCAMPO, R.; STOPPANI, A.O.M.; 1979a

Citocromos en la forma epimastigote del Trypanosoma cruzi.

Rev. Arg. Microbiol., 11: 22-36.

De BOISO, J.F.; DOCAMPO, R.; STOPPANI, A.O.M.; FRASCH, A.C.C.; 1979b

Efecto de la antimicina A sobre la respiración y el cre-

cimiento del Trypanosoma cruzi.

Medicina (Buenos Aires), 39: 362-368.

De BOISO, J.F.; STOPPANI, A.O.M.; 1973

The mechanism of acetate and pyruvate oxidation by Trypanosoma cruzi.

J. Protozool., 20: 673-678.

DECKER, J.E.; JANOVY, J. jr.; 1974

Leishmania donovani and L. mexicana: Production of the excretion factor.

Comp. Biochem. Physiol., 49: 513-523.

De ISOLA, E.L.; LAMMEL, E.M.; GONZALEZ-CAPPA, S.M.; 1984

Characteristics of interaction between Trypanosoma cruzi epimastigotes and Triatoma infestans homogenate.

J. Protozool., 31: 27A.

De ISOLA, E.L.; LAMMEL, E.M.; KATZIN, V.J.; GONZALEZ-CAPPA, S.M.; 1981

Influence of organ extracts of Triatoma infestans on differentiation of Trypanosoma cruzi.

J. Parasitol., 67: 53-58.

De ISOLA, E.L.; LAMMEL, E.M.; MULLER, L.; GONZALEZ-CAPPA, S.M.; 1983

Culture medium for a continuous source of infective metacyclic forms of Trypanosoma cruzi.

J. Protozool., 30: 165.

De MEIRELLES, M.N.L.; SOUZA, W. De; 1982

Trypanosoma cruzi: Ultrastructural cytochemistry of mitochondrial enzymes.

Exp. Parasitol., 53: 341-354.

De MEIRELLES, M.N.L.; SOUZA, W. De; 1984

Localization of a  $Mg^{2+}$ -activated ATPase in the plasma membrane of Trypanosoma cruzi.

J. Protozool., 31: 135-140.

De SASTRE, M.B.R.; STOPPANI, A.O.M.; 1973

Demonstration of a  $Mg^{2+}$ -activated adenosine triphosphatase in Trypanosoma cruzi.

FEBS Lett., 31: 137-142.

DESOWITZ, R.S.; 1963

The development and survival of the bloodstream forms of Trypanosoma conorhini in culture.

J. Protozool., 10: 390-391.

DIAS, E.; 1934

Estudios sobre o Schizotrypanum cruzi.

Mem. Inst. Oswaldo Cruz, 28: 1

(Citado por HOARE, 1972).

DOCAMPO, R.; CRUZ, F.S.; LEON, W.; SCHMUÑIS, G.A.; 1979

Acetate oxidation by bloodstream forms of Trypanosoma cruzi.

J. Protozool., 26: 301-303.

DOCAMPO, R.; De BOISO, J.F.; STOPPANI, A.O.M.; 1976

Actividad de la gliceraldehido-3-fosfato dehidrogenasa en la fracción soluble de epimastigotes normales y disquinetoplásticos de Trypanosoma cruzi.

Rev. Asoc. Arg. Microbiol., 8: 21

(citado por CAZZULO, 1978)

DOUTHIT, H.A.; AIRTH, R.L.; 1966

Arch. Biochem. Biophys., 113: 331

(Citado por WITTLIFF y AIRTH, 1970a)

DUSANIC, D.G.; 1980

In vitro production of metacyclic trypomastigotes of

Trypanosoma cruzi.

J. Parasitol., 66: 1046-1049.

DVORAK, J.A.; SCHMUÑIS, G.A.; 1972

Trypanosoma cruzi: Interaction with mouse peritoneal macrophages.

Exp. Parasitol., 32: 289-300.

ELLENBOGEN, B.B.; HUTNER, S.H.; TAMBURRO, K.M.; 1972

Temperature-enhanced osmotic growth requirement of Cri-  
thidia.

J. Protozool., 19: 349-354.

ENNEVER, J.; VOGEL, J.J.; STRECKFUSS, J.L.; 1971

Synthetic medium for calcification of Bacterionema ma-  
truchotii.

J. Dent. Res., 50: 1327-1330.

ENNEVER, J.; VOGEL, J.J.; STRECKFUSS, J.L.; 1974

Calcification by Escherichia coli.

J. Bacteriol., 119: 1061-1062.

FAIRBAIRN, D.; 1958.

Trehalose and glucose in helminths and others invertebrates.

Can. J. Zool., 36: 787-795.



FELIX, C.R.; CALDAS, R.A.; CERON, C.R.; ROITMAN, I.; 1978  
Cyanide-sensitive and insensitive respiration of Trypano-  
soma cruzi.

Ann. Trop. Med. Parasitol., 72: 89-91.

FERDINANDUS, J.; CLARK, J.B.; 1969

The phosphofructokinase of Arthrobacter crystallopoietes.  
Biochem. J., 113: 735-736.

FERNANDES, J.F.; CASTELLANI, O.; KIMURA, E.; 1969

Physiological events in the course of the growth and di-  
fferentiation of Trypanosoma cruzi.

Genetics Suppl., 61: 213-226.

FERRON-VILCHES, M.C.; RIVADENEYRA, M.A.; PEREZ-GARCIA, I.;

RAMOS-CORMENZANA, A.; 1984

Precipitación de calcita y estruvita por bacterias aisla-  
das de las aguas del pantano del Cubillas.

Ars Pharm., XXV: 341-348.

FLYNN, I.W.; BOWMAN, I.B.R.; 1980

Purification and characterization of pyruvate kinase from  
Trypanosoma brucei.

Archs. Biochem. Biophys., 200: 401-409.

FRANCO Da SILVEIRA, J.; ZINGALES, B.; COLLI, W.; 1977  
Characterization of adenylyl cyclase activity in particulate preparations from epimastigotes forms of Trypanosoma cruzi.

Biochem. Biophys. Acta, 481: 722-733.

FRASCH, A.C.C.; CAZZULO, J.J.; STOPPANI, A.O.M.; 1978a  
Solubilization and some properties of the  $Mg^{2+}$ -activated adenosine triphosphatase from Trypanosoma cruzi.

Comp. Biochem. Physiol., 61B: 207-212.

FRASCH, A.C.C.; SEGURA, E.L.; CAZZULO, J.J.; STOPPANI, A.O.M.; 1978b

Adenosine triphosphatase activities in Trypanosoma cruzi.

Comp. Biochem. Physiol., 60B: 271-275.

FUJITA, A.; 1955

Thiaminase.

En: "Methods in enzymology", S.P. Colowick y N.O. Kaplan (eds), 2, pp. 622-628, Academic Press, New York.

FUNAMAYA, S.; FUNAMAYA, S.; ITO, I.; VEIGA, L.A.; 1977  
Trypanosoma cruzi: Kinetic properties of glucose-6-phosphate dehydrogenase.

Exp. Parasitol., 43: 376-381.

GAMARRO CONDE, F.; 1984

Contribución al conocimiento de la interacción entre Trypanosoma cruzi-célula hospedadora.

Tesis. Universidad de Granada. 488 pp.

GARCIA, E.S.; DVORAK, J.A.; 1982

Growth and development of two Trypanosoma cruzi clones in the arthropod Dipetalogaster maximus.

Amer. J. Trop. Med. Hyg., 31: 259-262.

GARCIA, E.S.; GILLIAM, F.C.; 1980

Trypanosoma cruzi development is independent of protein digestion in the gut of Rhodnius prolixus.

J. Parasitol., 66: 1052-1053.

GEREZ De BURGOS, N.M.; BLANCO, A.; SEGURA, E.L.; 1978

Formas moleculares de alfa-hidroxiácido dehidrogenasa en Trypanosoma cruzi.

Medicina (Buenos Aires), 38: 151-154.

GEREZ De BURGOS, N.M.; BURGOS, C.; BLANCO, A.; PAULONE, I.; SEGURA, E.L.; 1976

Actividad alfa-hidroxiácido dehidrogenasa en Trypanosoma cruzi.

Acta Physiol Lat. Amer., 26: 10-19.

GOLDBERG, E.; 1957

Studies on the intermediary metabolism of Trichinella spiralis.

Exp. Parasitol., 6: 367-382.

GOLDSMITH, R.S.; ZARTE, R.; KAGAN, I.; y col., 1978

El potencial de la transmisión en la enfermedad de Chagas por transfusión sanguínea: Hallazgos serológicos entre donadores en el estado de Oaxaca.

Sal. Pub. Mex., 20: 439-444.

(Citado por KATZ y col., 1982)

GONÇALVES, M.F.; ZINGALES, B.; COLLI, W.; 1980

cAMP phosphodiesterase and activator protein of mammalian cAMP phosphodiesterase from Trypanosoma cruzi.

Mol. Biochem. Parasitol., 1: 107-118.

GORDON, H.A.; HART, P.D.; YOUNG, M.R.; 1980

Ammonia inhibits phagosome-lysosome fusion in macrophages.

Nature, 286: 79-80.

GRACE, T.D.C.; 1962

Establishment of four strains of cells from insect tissues grown in vitro.

Nature, 195: 788-789.

GREENFIELD, L.J.; 1963

Metabolism and concentration of calcium and magnesium and precipitation of calcium carbonate by a marine bacterium. Ann. N. Y. Acad. Sci., 109: 23-45.

GUTTERIDGE, W.E.; 1976

Biochemistry of Trypanosoma cruzi.

En: "American Trypanosomiasis Research", Sci. Pub. No. 318, pp. 135-140, P.A.H.O., Washington.

GUTTERIDGE, W.E.; 1981

Trypanosoma cruzi: Recent biochemical advances.

Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg., 75: 484-492.

GUTTERIDGE, W.E.; COOMBS, G.H.; 1977

Biochemistry of parasitic protozoa.

Macmillan Press Ltd., London.

GUTTERIDGE, W.E.; ROGERSON, G.W.; 1979

Biochemical aspects of the biology of Trypanosoma cruzi.

En: "Biology of the Kinetoplastida", vol. 2, pp 619-652, W.H.R. Lumsden y D.A. Evans (eds), Academic Press, London.

GUTTMAN, H.N.; 1963

Experimental glimpses of the lower Trypanosomatidae.

Exp. Parasitol., 13: 129-143.

GUTTMAN, H.N.; 1967

Patterns of methionine and lysine biosynthesis in the Trypanosomatidae during growth.

J. Protozool., 14: 267-271.

HAMMOND, D.J.; GUTTERIDGE, W.E.; OPPERDOES, F.R.; 1981

A novel location of two enzymes of de novo pyrimidine biosynthesis in trypanosomes and Leishmania.

FEBS Lett., 128: 27-29.

HAN, P.F.; JOHNSON, J.jr.; 1982

Fructose-1,6-bisphosphatase from turkey liver.

En: "Methods in enzymology", W.A. Wood (ed), 90, pp. 334-340, Academic Press, New York.

HARINGTON, J.S.; 1961a

Studies of the amino acids of Rhodnius prolixus. I. Analysis of the haemolymph.

Parasitol., 51: 309-318.

HARINGTON, J.S.; 1961b

Studies of amino acids of Rhodnius prolixus.II.Analysis of the excretory material.

Parasitol., 51: 319-326.

HART, D.T.; OPPERDOES, F.R.; 1984

The ocurrence of glycosomes (microbodies) in the promastigote stage of four major Leishmania species.

Mol. Biochem. Parasitol., 13: 159-172.

HERRERO, E.; MARTINEZ, J.P.; SENTANDREU, R.; 1984

Los sentidos de las células.

Mundo Científico, 4: 514-522.

HERS, H.G.; HUE, L.; 1983

Gluconeogenesis and related aspects of glycolysis.

Annu. Rev. Biochem., 52: 617-653.

HOARE, C.A.; 1972

The trypanosomes of mammals.

Blackwell Scientific Publications, Oxford y Cambridge.

HUNTER, K.W.; COOK, C.L.; HENSEN, S.A.; 1982

Temperature-induced in vitro transformation of Leishmania mexicana.I.Ultrastructural comparasion of culture-transformed and intracellular amastigotes.

Acta Trop., 39: 143-150.

ITOW, S.; CAMARGO, E.P.; 1977

Proteolytic activities in cells extracts of Trypanosoma cruzi.

J. Protozool., 24: 591-595.

JACKSON, P.R.; FISHER, F.M.jr.; 1977

Carbohidrate effects on amino acid transport by Trypanosoma equiperdum.

J. Protozool., 24: 345-353.

JIMENEZ ORTIZ, M.A.; 1981

Cultivo in vitro de Trypanosoma cruzi: Aspectos de las interrelaciones parásito-célula hospedadora.

Tesis. Facultad de Farmacia, Universidad de Granada, 361 pp.

JONES, T.C.; HIRSCH, J.G.; 1972

The interaction between Toxoplasma gondii and mammalian cells.II.Mechanism of entry and intracellular fate of the parasites.

J. Exp. Med., 136: 1173-1194.

JOSHI, M.D.; JAGANNATHAN, V.; 1966

Hexokinase.I.Brain.



En: "Methods in enzymology", W.A. Wood (ed), 2, 371-375,  
Academic Press, New York.

JUAN, S.M.; CAZZULO, J.J.; SEGURA, E.L.; 1976a

The pyruvate kinase of Trypanosoma cruzi.

Acta Physiol. Lat. Amer., 26: 424-426.

JUAN, S.M.; CAZZULO, J.J.; SEGURA, E.L.; 1976b

Algunas propiedades de la malato dehidrogenasa del Trypanosoma cruzi.

Rev. Asoc. Arg. Microbiol., 8: 114.

(Citado por CAZZULO, 1978).

JUAN, S.M.; CAZZULO, J.J.; SEGURA, E.L.; 1977

The citrate synthase from Trypanosoma cruzi.

J. Parasitol., 63: 921-922.

KALLINIKOVA, V.D.; 1968

Cytochemical study of enzymes of the respiratory chain  
in the life cycle of Trypanosoma cruzi Chagas, 1901. I.

Enzymes of the respiratory chain at all stages of the  
life cycle in vivo and in culture.

Acta Protozool., 5: 395-403.

KATZ, M.; DESPOMMIER, D.D.; GWADZ, R.; 1982

Parasitic diseases. Springer Verlag, New York, 264 pp.

KATZIN, V.J.; AÑASCO, N.; De ISOLA, E.L.; GONZALEZ-CAPPA, S.M.; 1983

Characterization of Trypanosoma cruzi metacyclic forms differentiated from epimastigotes. A comparative study between both stages.

Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo, 25: 55-61.

KAUSHAL, D.C.; CARTER, R.; MILLER, L.H.; KRISHNA, G.; 1980

Gametocytogenesis by malaria parasites in continuous culture.

Nature, 286: 490-492.

KELLERMAN, K.F.; SMITH, N.R.; 1914

Bacterial precipitation of calcium carbonate.

J. Wash. Acad. Sci., 4: 400-402.

(Citado por RIVADENEYRA y col., 1983)

KELSER, R.A.; 1936

A complement-fixation test for Chagas' disease employing an artificial culture antigen.

Amer. J. Trop. Med., 16: 405-415.

KELLY, G.J.; TURNER, J.F.; 1968

Inhibition of pea seed phosphofructokinase by phosphoenolpyruvate.

Biochem. Biophys. Res. Commun., 30: 195-199.

KIMURA, E.; LAY, W.H.; FERNANDES, J.F.; 1978

Extracellular in vitro evolution of metacyclic trypomastigotes isolated from Trypanosoma cruzi cultures.

Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo, 20: 133-138.

KIMURA, R.; 1965

En: "Review of Japanese literature on beriberi and thiamine" p. 255, Vitamin B Research Committee of Japan, Tokyo.

(Citado por WITTLIFF y AIRTH, 1970a y b)

KLEIN, R.A.; LINSTED, D.J.; WHEELER, M.V.; 1975

Carbon dioxide fixation in trypanosomatids.

Parasitol., 71: 93-107.

KOBERLE, F.; 1968

Chagas' disease and Chagas' syndromes: The pathology of American trypanosomiasis.

En: "Advances in Parasitology", B. Dawes (ed), pp. 63-116.

Academic Press, New York.

KREBS, H.A.; 1953

Biochem. J., 54: 78

(Citado por SIEBERT, 1963)

LANAR, D.E.; 1979

Growth and differentiation of Trypanosoma cruzi cultivated with a Triatoma infestans embryo cell line.

J. Protozool., 26: 457-462.

LEHMANN, D.L.; 1963

Comparative utilization of carbohydrates by culture forms of Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi and T. ranarum.

Ann. Trop. Med. Parasitol., 57: 232-234.

LEHNINGER, A.L.; 1972

Bioquímica. Ed. Omega, Barcelona, 887 pp.

LINDER, J.C.; STAEHELIN, L.A.; 1979

A novel model for fluid secretion by the trypanosomatid contractile vacuole apparatus.

J. Cell. Biol., 83: 371-382.

LING, K.H.; PAETKAU, V.; MARCUS, F.; LARDY, H.A.; 1966

Phosphofructokinase. I. Skeletal muscle.

En: "Methods in enzymology", W.A. Wood (ed.), 9, pp. 425-429, Academic Press, New York.

LOHR, G.W.; WALLER, H.D.; 1965

Glucose-6-phosphate dehydrogenase.

En: "Methods of enzymatic analysis", H.U. Bergmeyer (ed), pp. 744-752, Academic Press, New York.

LOPETEGUI, R.; SOSA-MIATELLO, C.; 1982.

Desarrollo y diferenciación de Trypanosoma cruzi en medios líquidos libres de células.

Rev. Lat. Amer. Microbiol., 24: 125-133.

LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDALL, R.J.; 1951

Protein measurement with the Folin phenol reagent.

J. Biol. Chem., 193: 265-275.

LWOFF, M.; 1938

L'hématine et l'acide ascorbique facteurs de croissance pour le flagellé Schizotrypanum cruzi.

C. R. Hebd. Séan. Acad. Sci. Paris, 206: 540-542.

MACARINI, J.D.; 1978

Characterization of minimal synthetic medium and condi-

tions for growing Nocardia rhodnii, the symbiont of Rhodnius prolixus.

Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo, 20: 257

MACARINI, J.D.; CORREIA, M.; 1978

Production and excretion of vitamins by Nocardia rhodnii, the symbiont of Rhodnius prolixus.

Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo, 20: 256-257.

MACARINI, J.D.; GARCIA, E.S.; 1972

A synthetic medium for Nocardia rhodnii, a monoxenic symbiont of Rhodnius prolixus.

Anais Acad. Brasil. Cienc., 44: 604.

MacNEAL, W.J.; 1904

The life-history of Trypanosoma lewisi and of T. brucei.

J. Infect. Dis., 1: 517-543.

(Citado por TAYLOR y BAKER, 1968)

MAHLER, H.R.; JAYNES, P.K.; McDONOUGH, J.P.; HANSON, D.K.;  
1981

Catabolite repression in yeast: Mediation by cAMP.

En : "Current topics in cellular regulation", 18, pp. 455-474, R.W. Estabrook y P.Srere (eds), Academic Press, N. Y.

MALLICK, U.; HERRLICH, P.; 1979

Regulation of synthesis of a major outer membrane protein: cyclicAMP represses Escherichia coli protein III synthesis. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76: 5520-5523.

MANCILLA, R.; NAQUIRA, C.; 1964

Comparative metabolism of C<sup>14</sup>-glucose in two strains of Trypanosoma cruzi.

J. Protozool., 11: 509-513.

MANCINI, P.E.; PATTON, C.L.; 1981

Cyclic 3', 5'-adenosine monophosphate levels during the developmental cycle of Trypanosoma brucei brucei in the rat.

Mol. Biochem. Parasitol., 3: 19-31.

MARR, J.J.; BERENS, R.L.; 1977

Regulation of aerobic fermentation in protozoans. VI. Comparative biochemistry of pathogenic and nonpathogenic protozoans.

Acta Trop., 34: 143-155.

MARTIN, A.N.; 1967

Principios de Fisico-Química para Farmacia y Biología.

Ed. Alhambra, Madrid, 744 pp.

MARTIN, E.; SIMON, M.W.; SCHAEFER, III, F.W.; MUKKADA, A.J.;  
1976

Enzymes of carbohydrate metabolism in four human species  
of Leishmania: A comparative survey.

J. Protozool., 23: 600-607.

MEADE, J.C.; GLASER, T.A.; BONVENTRE, P.F.; MUKKADA, A.J.;  
1984

Enzymes of carbohydrate metabolism in Leishmania donovani  
amastigotes.

J. Protozool., 31: 156-161.

MEGLITSCH, P.A.; 1978

Zoología de invertebrados. H. Blume (ed), Madrid, 906 pp.

MEYER, H.; SOUZA, W. De; 1973

On the fine structure of Trypanosoma cruzi in tissue cul-  
tures of pigment epithelium from chick embryo. Uptake of  
melanine granules by the parasite.

J. Protozool., 20: 590-593.

MILDER, R.; DEANE, M.P.; 1969

The cytostome of Trypanosoma cruzi and T. conorhini.

J. Protozool., 16: 730-737.



MILES, M.A.; 1976

Distribution and importance of Triatominae as vectors of T. cruzi.

En: "American Trypanosomiasis Research" Sci. Pub. No. 318, pp. 48-56, P.A.H.O., Washington.

MILLER, P.G.G.; LINSTED, D.J.; KLEIN, R.A.; 1976

Routes for the synthesis and utilization of acetyl CoA in trypanosomatids flagellates.

Parasitol., 73: XVI.

MORITA, R.Y.; 1980

Calcite precipitation by marine bacteria.

Geomicrobiol. J., 2: 63-82.

MOWBRAY, J.; MOSES, V.; 1976

The tentative identification in Escherichia coli of a multienzyme complex with glycolytic activity.

Eur. J. Biochem., 66: 25-36.

MUHELPFORDT, H.; 1959

Der einfluss des darmsymbionten von Rhodnius prolixus auf Trypanosoma cruzi.

Z. Tropenmed. Parasitol., 10: 314-327.

MUKKADA, A.J.; SCHAEFER, III, F.W.; SIMON, M.W.; NEU, C.  
1974

Delayed in vitro utilization of glucose by Leishmania  
tropica promastigotes.

J. Protozool., 21: 393-397.

MURATA, K.; 1965

En: "Review of Japanese literature on beriberi and thia-  
mine", p. 220, Vitamin B Research Committee of Japan,  
Tokyo.

(Citado por WITTLIFF y AIRTH, 1970a y b).

NICOLLE, C.; 1908

Culture du parasite du bouton d'Orient.

C. R. Hebd. Seanc. Acad. Sci. Paris, 146: 842-843.

(Citado por TAYLOR y BAKER, 1968).

NIMMO, H.G.; TIPTON, K.F.; 1982

Fructose-bisphosphatase from Ox liver.

En: "Methods in enzymology", W.A. Wood (ed), 90, 330-  
334, Academic Press, New York.

NISHIMURA, H.; YOSHIOKA, K.; IWASHIMA, A.; 1984

A method for determining binding kinetics applied to

thiamine-binding protein.

Anal. Biochem., 139: 373-376.

NOGUCHI, H.; LINDENBERG, A.; 1925

The isolation and maintenance of Leishmania on the medium employed for the cultivation of organisms of the Leptospira group of spirochetes.

Am. J. Trop. Med., 5: 63-68.

(Citado por TAYLOR y BAKER, 1968).

NOVY, F.G.; MAC NEAL, W.J.; 1903

The cultivation of Trypanosoma brucei.

J. Amer. Med. Assoc., 41: 1266.

(Citado por HOARE, 1972).

NWAGWU, M.; OPPERDOES, F.R.; 1982

Regulation of glycolysis in Trypanosoma brucei: hexokinase and phosphofructokinase activity.

Acta Trop., 39: 61-72.

NYIRADY, S.A.; 1973

The germfree culture of three species of Triatominae:

Triatoma protracta (Uhler), Triatoma rubida (Uhler) and Rhodnius prolixus Stäl.

J. Med. Ent., 10: 417-448.

OCHOA, S.; 1955

Crystalline condensing enzyme from pig heart.

En: "Methods in enzymology", S.P. Colowick y N.O. Keplan (eds), 1, 685-694, Academic Press, New York.

O'DALY, J.A.; 1975

A new liquid medium for Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi.

J. Protozool., 22: 265-270.

O'DALY, J.A.; 1976

Effect of fetal calf serum fractions and proteins on division and transformation of Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi in vitro.

J. Protozool., 23: 577-583.

ODURO, K.K.; BOWMAN, I.B.R.; FLYNN, I.W.; 1980

Trypanosoma brucei: Preparation and some properties of a multienzyme complex catalysing part of the glycolytic pathway.

Exp. Parasitol., 50: 240-250.

OLIVEIRA, M.M.; ANTUNES, A.; MELLO, F.G.De; 1984

Growth of Trypanosoma cruzi epimastigotes controlled by

shifts in cyclic AMP mediated by adrenergic ligands.

Mol. Biochem. Parasitol., 11: 283-292.

OPPERDOES, F.R.; 1981

A rapid method for the isolation of intact glycosomes from Trypanosoma brucei by Percoll gradient centrifugation in a vertical rotor.

Mol. Biochem. Parasitol., 3: 181-186.

OPPERDOES, F.R.; 1983

Glycolysis as target for the development of new trypanocidal drugs.

En: "Mechanism of drug action", T.P. Singer, T.E. Mansour y R.N. Undarza (eds), pp. 121-132, Academic Press, New York.

OPPERDOES, F.R.; BORST, P.; 1977

Localization of nine glycolytic enzymes in a microbody-like organelle in Trypanosoma brucei: the glycosome.

FEBS Lett., 80: 360-363.

OPPERDOES, F.R.; COTTEM, D.; 1982

Involvement of the glycosome of Trypanosoma brucei in carbon dioxide fixation.

FEBS Lett., 143: 60-64.

OPPERDOES, F.R.; MARKOS, A.; STEIGER, R.F.; 1981

Localisation of malate dehydrogenase, adenylate kinase and glycolytic enzymes in glycosomes and the threonine pathway in the mitochondrion of cultured procyclic trypanomastigotes of Trypanosoma brucei.

Mol. Biochem. Parasitol., 4: 291-309.

OPPERDOES, F.R.; NWAGWU, M.; 1980

En: "The host-invader interplay", pp.683-686, Elsevier/North-Holland Biochemical Press, Amsterdam.

(Citado por OPPERDOES, 1983).

OSUNA-CARRILLO, A.; JIMENEZ ORTIZ, A.; LOZANO MALDONADO, J.; 1979

Medios de cultivo para la obtención de formas metacíclicas de Trypanosoma cruzi. I.

Rev. Iber. Parasitol., 39: 129-133.

OSUNA, A.; GAMARRO, F.; CASTANYS, S.; RUIZ PEREZ, L.M.; 1985a

Inhibition of lysosomal fusion by Trypanosoma cruzi in peritoneal macrophages.

Int. J. Parasitol. (en prensa).

OSUNA, A.; GAMARRO, F.; CASTANYS, S.; RUIZ PEREZ, L.M.;  
ADROHER, F.J.; 1985b

Action of diphtheria toxin, modeccin and ricin in culture HeLa cells infected by Trypanosoma cruzi.

(enviado para publicación al J. Biol. Chem.)

OTTAWAY, J.H.; MOWBRAY, J.; 1977

Curr. Top. Cell. Regul., 12: 107-208.

(Citado por OPPERDOES, 1983).

OYA, H.; KILUCHI, G.; BANDO, T.; HAYASHI, H.; 1965

Muscle tricarboxilic acid cycle in Ascaris lumbricoides  
var. suis.

Exp. Parasitol., 17: 229-240.

OZANICH, K.M.; MARR, J.J.; 1976

Regulation of aerobic fermentation in protozoans. IV.

The relationship of adenosine triphosphate inhibition of phosphofructokinase to the regulation of glycolysis.

PAN, C.T.; 1971

Cultivation and morphogenesis of Trypanosoma cruzi in improved liquid media.

J. Protozool., 18: 556-560.

PASTAN, I.H.; JOHNSON, G.S.; ANDERSON, W.B.; 1975

Role of cyclic nucleotides in growth control.

Annu. Rev. Biochem., 44: 491-521.

PEREIRA, M.E.A.; LOURES, M.A.; VILLALTA, F.; ANDRADE, A.  
F.B.; 1980

Lectin receptors as markers for Trypanosoma cruzi developmental stages and a study of the interaction of wheat germ agglutinin with sialic acid residues on epimastigote cells.

J. Exp. Med., 152: 1375-1392.

PEREIRA, M.E.A.; ANDRADE, A.F.B.; RIBEIRO, J.M.C.; 1981

Science, 211: 597-600.

(Citado por COX, 1982).

PEREIRA, N.M.; TIMM, S.L.; Da COSTA, S.G.G.; REBELLO, M.A.;  
SOUZA, W. De; 1978

Trypanosoma cruzi: Isolation and characterization of membrane and flagellar fractions.

Exp. Parasitol., 46: 225-234.

PRASAD, K.N.; 1975

Differentiation of neuroblastoma cells in culture.

Biol. Rev., 50: 129-165.



PRICHARD, R.K.; SCHOFIELD, P.J.; 1968

A comparative study of the tricarboxilic acid cycle enzymes in Fasciola hepatica and rat liver.

Comp. Biochem. Physiol., 25: 1005-1019.

RACAGNI, G.E.; MACHADO De DOMENECH, E.E.; 1983

Characterization of Trypanosoma cruzi hexokinase.

Mol. Biochem. Parasitol., 9: 181-188.

RAMOS-CORMENZANA, A.; PEREZ-MIRANDA, M.C.; BOQUET, E.; 1975

Medios de cultivo sólidos para el estudio de la formación de cristales por microorganismos.

Ars Pharm., XVI: 335-343.

RAW, I.; 1959

Some aspects of carbohydrate metabolism of cultural forms of Trypanosoma cruzi.

Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo, 1: 192-194.

REY, L.; 1973

Parasitologia, Ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 695 pp.

RIVADENEYRA, M.A.; RAMOS-CORMENZANA, A.; GARCIA-CERVIGON, A.;

1983

Bacterial formation of struvite.

Geomicrobiol. J., 3: 151-163.

ROBINSON, H.; 1889

On the formation of struvite by microorganisms.

Proc. Camb. Phil. Soc., 6: 360.

(Citado por BEAVON y HEATLEY, 1962)

ROGERSON, G.W.; GUTTERIDGE, W.E.; 1976

Enzymes of energy metabolism in the culture, blood and intracellular forms Trypanosoma cruzi.

Parasitol., 73: XV.

ROGERSON, G.W.; GUTTERIDGE, W.E.; 1978

Aspects of energy metabolism in Trypanosoma cruzi.

Parasitol., 77: XI.

ROGERSON, G.W.; GUTTERIDGE, W.E.; 1979

Oxidative metabolism in mammalian and culture forms of Trypanosoma cruzi.

Int. J. Biochem., 10: 1019-1023.

ROGERSON, G.W.; GUTTERIDGE, W.E.; 1980

Catabolic metabolism in Trypanosoma cruzi.

Int. J. Parasitol., 10: 131-135.

ROITMAN, I.; 1976

Perspectives for a defined culture medium for T. cruzi.

En: "American Trypanosomiasis Research", Sci. Pub. No. 318, pp. 179-180, P.A.H.O., Washington.

ROITMAN, I.; BRENER, Z.; ROITMAN, C.; KITAJIMA, E.W.; 1976

Demonstration that Leptomonas pessoai Galvao, Oliveira, Carvalho and Veiga, 1970, is a Herpetomonas.

J. Protozool., 23, 291-293.

ROITMAN, I.; GUTTERIDGE, W.E.; 1978

Synthesis of lipids in Trypanosoma cruzi.

Pesquisa Basica em Doença de Chagas. V Reuniao Anual, Ca-xambú, Brasil, p. 9.

ROSEN, O.M.; ROSEN, S.M.; HORECKER, B.L.; 1966

Fructose-1,6-diphosphatase. II. Candida utilis.

En: "Methods in enzymology" W.A.Wood (ed), 9, pp. 632-636, Academic Press, New York.

RYLEY, J.F.; 1956

Studies on the metabolism of the Protozoa. 7. Comparative carbohydrate metabolism of eleven species of Trypanosome.

Biochem. J., 62: 215-222.

RYLEY, J.F.; 1962

Studies on the metabolism of the Protozoa. 9. Comparative metabolism of bloodstream and culture forms of Trypanosoma rhodesiense.

Biochem. J., 85: 211-223.

SANABRIA, A.; ARISTIMUÑO, J.; 1970

Nuevos estudios acerca de la ultraestructura del Trypanosoma cruzi en el miocardio del ratón.

Acta Cient. Venezol., 21: 107-118.

SANCHEZ, G.; 1974

The effect of some amino acids on carbohydrate uptake by Trypanosoma lewisi.

Comp. Biochem. Physiol., 47: 553-558.

SCHLEMPER, B.R. jr.; PIAZZA, R.M.F.; GARCIA, A.C.M.; 1983

Sero-epidemiologia da doença de Chagas em Santa Catarina.

Rev. Soc. Brasil. Med. Trop., 16: 196-201.

SEAMAN, G.R.; 1953a

The succinic dehydrogenase of Trypanosoma cruzi.

Exp. Parasitol., 2: 236-241.

SEAMAN, G.R.; 1953b

Inhibition of the succinic dehydrogenase of parasitic protozoans by an arsono and a phosphono analog of succinic acid.

Exp. Parasitol., 2: 366-373.

SENA LUSTOSA, E. De; 1978

Crescimento e diferenciação do Trypanosoma cruzi em medio liquido.

Rev. Pat. Trop., 7: 183-192.

SHAW, J.J.; VOLLER, A.; BRYANT, C.; 1964

Intermediary carbohydrate metabolism of four species of Trypanosomatidae.

Ann. Trop. Med. Parasitol., 58: 17-24.

SHER, A.; CRANE, M.S.J.; KIRCHHOFF, L.V.; 1983

Incubation in mice provides a signal for the differentiation of Trypanosoma cruzi epimastigotes to trypomastigotes.

J. Protozool., 30: 278-283.

SHER, A.; SNARY, D.; 1982

Specific inhibition of the morphogenesis of Trypanosoma cruzi by a monoclonal antibody.

Nature, 300: 639-640.

SHINANO, H.; SAKAI, M.; 1975

Effect of magnesium ion concentration on the types of crystals deposited by marine bacteria in sea water.

Bull. Jap. Soc. Sci. Fish, 41: 913.

SIEBERT, G.; 1963

Citrate and isocitrate.

En: "Methods of enzymatic analysis", H.U. Bergmeyer (ed) pp. 318-323, Academic Press, New York.

SILVA, I.I.; 1954

Método de cultivo del Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi para la preparación de antígenos.

An. Inst. Med., Tucumán, 4: 71-75.

SILVA, L.H.P.; CAMARGO, E.P.; 1964

Differentiation in the life cycle of Trypanosomes.

Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo, 6: 188-192.

SOUZA, W.; SOUTO-PADRON, T.; 1978

Consideration on the kinetoplast of Trypanosoma cruzi during cells differentiation.

Anais Acad. Brasil. Cienc., 50: 597.

SRERE, P.A.; 1969

Citrate synthase.

En: "Methods in enzymology", J.M. Lowenstein (ed), 13,  
pp. 3-11, Academic Press, New York.

STEINERT, M.; 1958

Action morphogenetique de l'urée sur le trypanosome.

Exp. Cell. Res., 15: 431-433.

(Citado por ZELEDON, 1971).

STOHLMAN, S.A.; KUWAHARA, S.S.; KAZAN, B.H.; 1973

Enzyme, protein and nucleic acid content of two morpho-  
logical forms of Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi.

Arch. Mikrobiol., 92: 301-311.

STOPPANI, A.O.M.; DOCAMPO, R.; BOISO, J.F.De; FRASCH,  
A.C.C.; 1980

Effect of inhibitors of electron transport and oxidati-  
ve phosphorylation on Trypanosoma cruzi respiration and  
growth.

Mol. Biochem. Parasitol., 2: 3-21.

STRECKFUSS, J.L.; SMITH, W.N.; BROWN, L.R.; CAMPBELL,  
M.M.; 1974.

Calcification of selected strains of Streptococcus mutans and Streptococcus sanguis.

J. Bacteriol., 120: 502-506.

STRICKLER, J.E.; PATTON, C.L.; 1975

Adenosine 3',5'-monophosphate in reproducing and differentiated trypanosomes.

Science, 190: 1110-1112.

SULLIVAN, J.J.; 1982

Metacyclogenesis of Trypanosoma cruzi in vitro: a simplified procedure.

Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg., 76: 300-303.

SYLVESTER, D.; KRASSNER, S.M.; 1976

Proline metabolism in Trypanosoma cruzi epimastigotes.

Comp. Biochem. Physiol., 55B: 443-447.

TABLAS CIENTIFICAS; 1965

Documenta Geigy, 6<sup>a</sup> ed., Basilea.

TAHIRA, A.A.; NAKANO, M.; VEIGA, L.A.; 1978

Purificação e propriedades da hexoquinase de Trypanosoma cruzi.

Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo, 20: 252.



TAVARES Da SILVA, J.B.; ROITMAN, I.; 1982

Effect of temperature and osmolarity on growth of Crithidia fasciculata, C. hutneri, C. luciliae thermophila and Herpetomonas samuelpessoai.

J. Protozool., 29: 269-272

TAYLOR, A.E.R.; BAKER, J.R.; 1968

The cultivation of parasites in vitro.

Blackwell Sci. Pub., Oxford y Edinburgh.

TAYLOR, M.B.; BERGHAUSEN, H.; HEYWORTH, P.; MESSENGER, N.;

REES, L.J.; GUTTERIDGE, W.E.; 1980

Subcellular localization of some glycolytic enzymes in parasitic flagellated protozoa.

Int. J. Biochem., 11, 117-120.

TOBIE, E.J.; Von BRAND, T.; MEHLMAN, B.; 1950

Cultural and physiological observations on Trypanosoma rhodesiense and Trypanosoma gambiense.

J. Parasitol., 36: 48-54.

UCROS, H.; GRANGER, B.; KRASSNER, S.M.; 1983

Trypanosoma cruzi: Effect of pH on in vitro formation of metacyclic trypomastigotes.

Acta Trop., 40: 105-112.

UNDERWOOD, A.H.; NEWSHOLME, E.A.; 1967

Some properties of phosphofructokinase from kidney cortex and their relation to glucose metabolism.

Biochem. J., 104:296-299.

URBINA, J.A.; AZAVACHE, V.; 1984

Regulation of energy metabolism in Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi. II. NAD<sup>+</sup>-dependent glutamate dehydrogenase.

Mol. Biochem. Parasitol., 11: 241-255.

URBINA, J.A.; CRESPO, A.; 1984

Regulation of energy metabolism in Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi. I. Hexokinase and phosphofructokinase.

Mol. Biochem. Parasitol., 11: 225-239.

USP XXI; 1985

United States Pharmacopeial Convention, Inc., p. 1210.

VALENTINE, W.N.; TANAKA, K.R.; 1966

Pyruvate kinase: clinical aspects.

En: "Methods in enzymology", W.A.Wood (ed), 2, pp. 468-473, Academic Press, New York.

VIANNA, G.; 1911

Contribuição para o estudo da anatomia patologica da "Mo-

lestitia de Carlos Chagas".

Mem. Inst. Oswaldo Cruz, 3: 276-294.

(Citado por HOARE, 1972)

VICKERMAN, K.; PRESTON, T.M.; 1976

Comparative cell biology of the kinetoplastid flagellates.

En: "Biology of the Kinetoplastida", vol. 1, pp. 35-130,

W.H.R.Lumsden y D.A.Evans (eds), Academic Press, London.

Von BRAND, T.; 1979

Biochemistry and Physiology of Endoparasites.

Elsevier/North-Holland Biomedical Press, Amsterdam.

Von BRAND, T.; AGOSIN, M.; 1955

The utilization of Krebs cycle intermediates by the culture forms of Trypanosoma cruzi and Leishmania tropica.

J. Infect. Dis., 97: 274-279.

Von BRAND, T.; TOBIE, E.J.; KISSLING, R.E.; ADAMS, G.; 1949

Physiological and pathological observations on four strain of Trypanosoma cruzi.

Von BRAND, T.; TOBIE, E.J.; HIGGINS, H.; 1967

Hexose and glycerol absorption by some Trypanosomatidae.

J. Protozool., 14: 8-14.

WALTER, R.D.; EBERT, F.; 1979

Evidence for NADH and NADPH-linked glutamate dehydrogenases in Trypanosoma cruzi epimastigotes.

J. Protozool., 26: 653-656.

WARREN, L.G.; 1960

Metabolism of Schizotrypanum cruzi (Chagas).I. Effect of culture age and substrate concentration on respiratory rate.

J. Parasitol., 46: 529-539.

WARREN, L.G.; KITZMAN, W.B.; 1963

Metabolism of Schizotrypanum cruzi, Chagas.II. Galactose utilization.

J. Parasitol., 49: 808-813.

WARREN, L.G.; PATRZEK, D.; 1963

Metabolismo de Schizotrypanum cruzi, Chagas. III. Evidencia en favor de un mecanismo de transporte activo de la galactosa y la fructosa.

Acta Cient. Venezol., Supl. 1: 127-134.

WARREN, L.G.; GUEVARA, A.; 1964

Metabolism of Schizotrypanum cruzi. IV. Evidence in favor of a hexokinase.

J. Protozool., 11: 107-108.

WARTON, A.; 1977

Cytochemical localization of cytochrome oxidase activity in Trypanosoma cruzi on optical microscope and electron microscope level.

5ºInt. Congress Protozool., New York, USA, abstract nº 112.

WENYON, C.M.; 1921

Trans. R. Soc. Med. Hyg., 15: 135-155.

(Citado por TAYLOR y BAKER, 1968)

WEST, E.S.; TODD, W.R.; MASON, H.S.; Van BRUGGEN, J.T.; 1969

Bioquímica Médica. Ed. Interamericana, México, 1214 pp.

WIGGLESWORTH, V.B.; 1931a

The physiology of excretion in a blood-sucking insect, Rhodnius prolixus (Hemiptera, Reduviidae).I. Composition of the urine.

J. Exp. Biol., 8: 411-427.

WIGGLESWORTH, V.B.; 1931b

The physiology of excretion in a blood-sucking insect, Rhodnius prolixus (Hemiptera, Reduviidae).III. The mechanism of uric acid excretion.

J. Exp. Biol., 8: 443-451.

WIGGLESWORTH, V.B.; 1959

Physiologie des Insectes. Dunod (ed), Paris, 137 pp.

WILLIAMS, G.T.; 1983

Trypanosoma cruzi: Inhibition of intracellular and extracellular differentiation by ADP-ribosyl transferase antagonists.

Exp. Parasitol., 56: 409-415.

WILLIAMS, G.T.; 1984

Specific inhibition of the differentiation of Trypanosoma cruzi.

J. Cell Biol., 99: 79-82.

WITTLIFF, J.L.; AIRTH, R.L.; 1970a

Thiaminase I (Thiamine:Base 2-methyl-4-aminopyrimidine-5-metenyl transferase, E.C. 2.5.1.2).

En:"Methods in enzymology", S.P.Colowick y N.O.Kaplan, (eds), 18, pp. 229-234, Academic Press, New York.

WITTLIFF, J.L.; AIRTH, R.L.; 1970b

Thiaminase II (Thiamine hydrolase, E.C. 3.5.99.2)

En:"Methods in enzymology", S.P.Colowick y N.O.Kaplan (eds), 18, pp. 234-238, Academic Press, New York.

WOOD, D.E.; 1975

Trypanosoma cruzi: Fatty acid metabolism in vitro.

Exp. Parasitol., 37: 60-66.

WOOD, D.E.; PIPKIN, A.C.; 1969

Multiplication and differentiation of Trypanosoma cruzi in an insect cell culture system.

Exp. Parasitol.; 24: 176-183.

WOOD, D.E.; SCHILLER, E.L.; 1975

Trypanosoma cruzi: Comparative fatty acid metabolism of the epimastigotes and trypomastigotes in vitro.

Exp. Parasitol., 38: 202-207.

WOOD, D.E.; SOUSA, O.E.; 1976

Trypanosoma cruzi: Effects of Rhodnius prolixus extracts on in vitro development.

Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo, 18: 93-96.

WOOD, W.A.; SCHWERDT, R.F.; 1954

Carbohydrate oxidation by Pseudomonas fluorescens.II. Mechanism of hexose phosphate oxidation.

J. Biol. Chem., 206: 625-635.

YOSHIDA, N.; 1975

A macromolecule-free partially defined medium for Trypanosoma cruzi.

J. Protozool., 22: 128-130.

YOSHIDA, N.; CAMARGO, E.P.; 1978

Ureotelism and ammoniotelism in trypanosomatids.

J. Bacteriol., 136: 1184-1186.

ZELEDON, R.; ALVARENGA, N.J.; 1976

Metacyclogenesis and ecology of Trypanosoma cruzi in the insect vector.

IV Congreso Latinoamericano de Parasitología.

San José de Costa Rica.

ZELEDON, R.; ALVARENGA, N.J.; SCHOSINSKY, K.; 1977

Ecology of Trypanosoma cruzi in the insect vector.

En: "Chagas' disease Symposium", Sci. Pub. No. 347, pp. 59-70, P.A.H.O., Washington.

ZELEDON, R.; BOLAÑOS, R.; ROJAS, M.; 1984

Scanning electron microscopy of the final phase of the life cycle of Trypanosoma cruzi in the insect vector.

Acta Trop., 41: 39-43.



ZELEDON, R.; 1960a

Comparative physiological studies on four species of hemoflagellates in culture. III. Effect of the Krebs' cycle intermediates on the respiration.

Rev. Biol. Trop., 8: 25-33.

ZELEDON, R.; 1960b

Comparative physiological studies on four species of hemoflagellates in culture. I. Endogenous respiration and respiration in the presence of glucose.

J. Protozool., 7: 146-150.

ZELEDON, R.; 1960c

Comparative physiological studies on four species of hemoflagellates in culture. II. Effect of carbohydrate and related substances and some amino compounds on the respiration.

J. Parasitol., 46: 541-551.

ZELEDON, R.; 1971

Cultivation and transformation of hemoflagellates. A review.

Rev. Biol. Trop., 19: 197-210.

ZINGALES, R.; CARNIOL, C.; ABRAHAMSOHN, P.A.; COLLI, W.;

1978

Purification of an adenylyl cyclase rich membrane fraction from Trypanosoma cruzi.

Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo, 20: 244-245.

ZINGALES, B.; CARNIOL, C.; ABRAHAMSOHN, P.A.; COLLI, W.;  
1979

Purification of an adenylyl cyclase-containing plasma membrane fraction from Trypanosoma cruzi.

Biochim. Biophys. Acta, 550: 233-244.

ANEXO

CRABTREE, H.G.; 1929

Biochem. J., 23: 536-540.

(Citado por LUPIAÑEZ CARA, 1972)

HOMMES, F.A.; 1965

Arch. Biochem. Biophys., 109: 168-171.

(Citado por LUPIAÑEZ CARA, 1972)

KREBS, H.A.; 1972

The Pasteur Effect and the relations between respiration and fermentation.

Essays Biochem., 8: 2-34.

LUPIAÑEZ CARA, J.A.; 1972

Producción de ácido succínico por cepas de Saccharomyces cerevisiae crecidas en hipoxia.

Tesina, Universidad de Granada, 75 pp.

FACULTAD DE FARMACIA DE GRANADA

PRESIDENTE

Prof. Dr. D. José González Castro

VOCALES

Prof. Dr. U. Fernán Sánchez de Medin

Prof. Dr. D. Francisco Navarro de Castro

Prof. Dr. D. Emilio Mancera

SECRETARIO

Prof. Dr. D. Carlos Alonso

Reunido en el día de la fecha, el Tribunal constituido por los Catedráticos que al margen se expresan, acordaron conceder al presente trabajo de TESIS DOCTORAL, la calificación de Sanamente, quedando anotado el folio \_\_\_\_\_ del Libro de Actas correspondiente, de todo lo cual como Secretario, doy té.

Granada, 5 de Julio de 1955.

Carlos Alonso