

UNIVERSIDAD DE COSTA RICA
FACULTAD DE MICROBIOLOGÍA

EXPRESIÓN DE LAS GLICOPROTEÍNAS DE SUPERFICIE
GP82 Y GP90, INVOLUCRADAS EN LA INVASIÓN CÉLULAR,
EN CEPAS COSTARRICENSES DE *Trypanosoma cruzi*

TRABAJO FINAL DE GRADUACIÓN PARA OPTAR AL GRADO DE
LICENCIATURA EN MICROBIOLOGÍA Y QUÍMICA CLÍNICA

PRESENTADO POR
MARÍA JOSÉ CARVAJAL CARVAJAL
CARNÉ A21159

COMITÉ ASESOR:
DR. OLGER CALDERÓN ARGUEDAS
DRA. SANDRA SILVA DE LA FUENTE
DR. MISAEL CHINCHILLA CARMONA

CIUDAD UNIVERSITARIA RODRIGO FACIO
SAN JOSÉ, COSTA RICA
2010



UNIVERSIDAD DE COSTA RICA
VICERRECTORÍA DE DOCENCIA

FACULTAD DE MICROBIOLOGÍA
CIUDAD UNIVERSITARIA RODRIGO FACIO

Acta de presentación de Requisito Final de Graduación

Sesión del Tribunal Examinador celebrada el jueves 06 de enero del año 2011 con el objeto de recibir el informe oral de la estudiante **MARÍA JOSÉ CARVAJAL CARVAJAL**, carné A21159, quien se acoge al Reglamento de Trabajos Finales de Graduación bajo la modalidad de **PRACTICA DE GRADUACIÓN**, para optar por el grado académico de **LICENCIADA EN MICROBIOLOGÍA Y QUÍMICA CLÍNICA** y el título profesional de **DOCTORA EN MICROBIOLOGÍA Y QUÍMICA CLÍNICA**.

Están presentes los siguientes miembros del tribunal:

Dra. Elizabeth Abrahams Sandí **PRESIDENTA**
Dr. Fernando García Santamaría
Dr. Olger Calderón Arguedas
Dra. María Gabriela Solano Trejos
Dra. Sandra Silva de la Fuente

ARTICULO 1

La presidenta informa que el expediente de **MARÍA JOSÉ CARVAJAL CARVAJAL**, contiene todos los documentos de rigor, incluyendo el recibo de pago de los derechos de graduación. Declara que la postulante cumplió con todos los demás requisitos del plan de estudios correspondientes, y por lo tanto, se solicita que proceda a hacer la exposición.

ARTICULO 2

La postulante **MARÍA JOSÉ CARVAJAL CARVAJAL**, hace la exposición oral de su trabajo de graduación título "Expresión de las glicoproteínas de superficie Gp82 y Gp90, involucradas en la invasión celular, en cepas costarricenses de *Trypanosoma cruzi*".

ARTICULO 3

Terminada la disertación, los miembros del Tribunal Examinador interrogan a la Postulante durante el tiempo reglamentario y, una vez concluido el interrogatorio, el Tribunal se retira a deliberar.

ARTICULO 4 (1)

El tribunal considera el trabajo final de graduación satisfactorio y le confiere la calificación de: 98

ARTICULO 5

La presidenta del Tribunal comunica a la Postulante el resultado de la deliberación y la declara acreedora al grado de Licenciada en Microbiología y Química Clínica y al título profesional de Doctora en Microbiología y Química Clínica.

Se le indica la obligación de presentarse al acto público de juramentación al que será oportunamente convocada. Se da lectura al acta que firman los Miembros del Tribunal Examinador y a la Postulante, a las 11:14 horas.

Dra. Elizabeth Abrahams Sandí
Presidenta

Dra. Fernando García Santamarí

Dr. Olga Calderón Arguedas

Dra. María Gabriela Solano Trejos

Dra. Sandra Silva de la Fuente

María José Carvajal Carvajal
Postulante

(1) El tribunal examinador considera que el trabajo merece la distinción honorífica.

DEDICATORIA

A Dios por darme fortaleza siempre,

A Pío por darme su amor y apoyo incondicional,

A mis padres, Vinicio y Rita, por su amor y por creer siempre en mí.

A Pipo por siempre ser la luz de mi camino.

AGRADECIMIENTOS

A mis tutores por su dedicación y valiosa ayuda, especialmente al Dr. Olger Calderón quien conceptualizó el esquema fundamental del presente trabajo, y a la Dra. Sandra Silva por todo su apoyo y cariño.

Agradezco al Dr. José María Gutiérrez, a la Dra. Alexandra Rucavado y a la Dra. Teresa Escalante, del Instituto Clodomiro Picado por su desinteresada ayuda y el tiempo que dedicaron a la confección de la columna de DEAE-Sepharosa, sin la cual no hubiera sido posible llevar a cabo los ensayos posteriores. También expreso mi gratitud hacia la Dra. Xinia Barrantes del Laboratorio de Análisis Clínicos y Moleculares ya que su aporte fue fundamental durante la realización de los ensayos de PCR. Agradezco además al Dr. Luis Alberto Morales del Laboratorio de Patología de la Escuela de Medicina Veterinaria, Universidad Nacional por su valiosa ayuda en el análisis histopatológico.

También le doy las gracias al personal del Departamento de Parasitología de la Facultad de Microbiología que generosamente contribuyeron de diversas maneras a la realización del presente trabajo, entre ellos destacan la Dra. Elizabeth Abrahms, la Dra. Adriana Troyo, el Sr. Iván Coronado y el Sr. Dennis Camareno.

Finalmente agradezco de manera muy especial al Dr. Rodrigo Zeledón por compartir conmigo su extenso conocimiento y su pragmática visión de la investigación académica, y por su generosa ayuda en la revisión de este trabajo.

ÍNDICE GENERAL

I. INTRODUCCIÓN	1
A. JUSTIFICACIÓN	1
B. ANTECEDENTES	4
<i>Trypanosoma cruzi</i>	4
Vías de Transmisión	7
Aspectos clínicos de la enfermedad de Chagas	10
C. MARCO TEÓRICO	12
II. HIPÓTESIS	15
III. OBJETIVOS	15
Objetivo General	15
Objetivos Específicos	15
IV. METODOLOGÍA	16
Cepas de <i>Trypanosoma cruzi</i> utilizadas	16
Obtención de epimastigotos y tripomastigotos metacíclicos	16
Extracción de ARN.....	18
PCR en Tiempo Real	18
Infección en Ratones	20
V. RESULTADOS	21
VI. DISCUSIÓN	28
VII. BIBLIOGRAFÍA	34

ÍNDICE DE ILUSTRACIONES

Figura 1. Curva de RT-PCR en tiempo real, ΔR_n vs Número de Ciclo, obtenida para las cuatro cepas de <i>Trypanosoma cruzi</i> en estudio, en orden de Ct creciente. (A) Glicoproteína gp82 y GAPDH; (B) Glicoproteína gp90 y GAPDH.	22
Figura 2. Razón de expresión de ARNm de las glicoproteínas gp82 y gp90 respecto a la GAPDH en los epimastigotos de las cepas de <i>T. cruzi</i> en estudio.....	23
Figura 3. Razón de expresión de ARNm de las glicoproteínas gp82 y gp90 respecto a la GAPDH en los tripomastigotos metacíclicos obtenidos <i>in vitro</i> de las cepas de <i>T. cruzi</i> en estudio.	24
Figura 4. Razón de la expresión normalizada de ARNm de las glicoproteínas gp82 y gp90 de los tripomastigotos metacíclicos obtenidos <i>in vitro</i> respecto a los epimastigotos de las cepas de <i>T. cruzi</i> en estudio.	25
Figura 5. Hallazgos histopatológicos en ratón C3H de 15 gr de peso infectado con la cepa TDIM/CR/2005/Santo Domingo, vía intraperitoneal. Se observa infiltrado mononuclear y un nido chagásico. Tinción con Hematoxilina Eosina.	27

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Normalización de los valores de Ct de ARNm de las glicoproteínas gp82 y gp90 de las cepas de <i>T. cruzi</i> en estudio.	25
--	----

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

ADNc	=	Ácido Desoxirribonucleico complementario.
ADNk	=	Ácido Desoxirribonucleico del cinetoplasto.
ARNm	=	Ácido Ribonucleico mensajero.
ARNr	=	Ácido Ribonucleico ribosomal.
Ct	=	Ciclo Umbral.
DEAE	=	Dietilaminoetil.
GAPDH	=	Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa.
Gp82	=	Glicoproteína 82.
Gp90	=	Glicoproteína 90.
IP ₃	=	Inositol trifosfato.
OAT	=	Orina Artificial de Triatomino.
PCR	=	Reacción en cadena de la polimerasa.
PGS 5:5	=	Tampón de Fosfatos con glucosa 1.0% p/v, pH 8.0, fuerza iónica 0.181.
PGS 6:4	=	Tampón de Fosfatos con glucosa 1.0% p/v, pH 8.0, fuerza iónica 0.217.
PS	=	Tampón de Fosfatos pH 8.0, fuerza iónica 0.362.
RFLP	=	Polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción.
Rn	=	Notificador normalizado.
RT-PCR	=	Reacción en cadena de la polimerasa en Transcripción reversa.
Δ Rn	=	Notificador normalizado con línea basal corregida.

RESUMEN

Se han identificado varias glicoproteínas de superficie de *Trypanosoma cruzi* involucradas en la adhesión e invasión celular. Dos glicoproteínas denominadas gp82 y gp90 han adquirido especial atención en los últimos años debido a que su expresión modula la infección de *T. cruzi*, especialmente a través de la mucosa gástrica. Además, se ha encontrado que la gp82 es altamente inmunogénica.

Se determinó la expresión de la gp82 y gp90 en epimastigotos y tripomastigotos metacíclicos obtenidos *in vitro* en cuatro cepas costarricenses de *T. cruzi* mediante RT-PCR en tiempo real. En los epimastigotos, los Cts para el gen constitutivo (GAPDH) fueron menores que los Cts de la gp82 y gp90. Esto indica que sí hay expresión de dichas glicoproteínas, aunque es menor que la expresión del gen constitutivo. En las formas metacíclicas la expresión de ambas glicoproteínas fue mayor respecto a los epimastigotos, excepto para la cepa Santa Rita cuya expresión de la gp90 fue menor respecto a los epimastigotos.

Tanto los epimastigotos como los tripomastigotos de las cepas costarricenses de *T. cruzi* expresan las glicoproteínas en estudio. Las diferencias observadas en la expresión de la gp82 y la gp90 entre las cepas de *T. cruzi* reflejan un comportamiento no homogéneo de los patrones de expresión de estas glicoproteínas, confirmando la heterogeneidad de las cepas de *T. cruzi*.

I. INTRODUCCIÓN

A. JUSTIFICACIÓN

La enfermedad de Chagas o tripanosomiasis americana se distribuye en nuestro continente desde el sur de Estados Unidos hasta Argentina y Chile, encontrándose principalmente en América Latina; sin embargo, en las últimas décadas se ha observado con mayor frecuencia en los Estados Unidos, Canadá, Europa y algunos países del Pacífico Occidental, lo que se debe a la movilidad de la población entre América Latina y el resto del mundo (Gascon, Bern y Pinazo, 2010). Se estima que a nivel mundial existen entre 15 y 17 millones de personas infectadas y 90 a 100 millones de personas expuestas a la infección. Estudios recientes indican que hay aproximadamente 200.000 nuevos casos y 21.000 muertes asociadas con la enfermedad por año (Coura y Borges-Pereira, 2010).

Esta enfermedad se encuentra dentro del grupo de enfermedades tropicales desatendidas, las cuales se deben principalmente a agentes infecciosos que proliferan en entornos empobrecidos, especialmente en el ambiente caluroso y húmedo de los climas tropicales. La enfermedad de Chagas se presenta en regiones donde coexiste con otras enfermedades que son más aparentes y menos silenciosas, razón por la cual frecuentemente pasa desapercibida como un problema de salud. Ésta, más que cualquier otra enfermedad parasitaria, se relaciona con el pobre desarrollo económico y social, la vivienda inadecuada,

la migración frecuente de personas, los frentes de colonización y la rápida urbanización (Conteh *et al*, 2010).

Las manifestaciones y características epidemiológicas de la enfermedad de Chagas o tripanosomiasis americana varían de una zona a otra, así como su prevalencia. Según las características epidemiológicas se pueden distinguir cinco grupos de países de acuerdo con los ciclos de transmisión, la presencia de vectores y los programas de control de transmisión vectorial o transfusional. Nuestro país se encuentra en el grupo II, junto con Colombia y México. Dicho grupo se caracteriza por la presencia del ciclo domiciliar y peridomiciliar, casos de cardiomiopatía chagásica crónica, además de la existencia de donadores infectados, y la carencia de programas de control o con programas de control incipientes (Coura y Dias, 2009). En los años 2001 y 2002, la prevalencia de anticuerpos anti *T. cruzi* en niños escolares entre los siete y doce años de edad se reportó entre 0,2 y 0,5% (Calvo *et al*, 2003). En el 2004 se realizó un estudio en los Bancos de Sangre de la Caja Costarricense del Seguro Social, en el cual se obtuvo 0,6% de reactividad inicial y una prevalencia de 0,08%, el porcentaje más bajo del área Centroamericana (Torres *et al*, 2004). En el 2006, un estudio realizado en niños escolares entre los seis y doce años de edad reportó una seroprevalencia de 0,1%, lo cual se atribuye a las mejores condiciones de vida actuales que han disminuido la incidencia de la Enfermedad de Chagas en Costa Rica (Chinchilla *et al*, 2006).

La enfermedad de Chagas es transmitida por varios mecanismos. La vía de transmisión oral ha adquirido especial atención en los últimos años ya que constituye una importante forma de transmisión en ciertas regiones geográficas donde se han reportado

microepidemias y brotes de la enfermedad adquirida por la ingestión de alimentos contaminados con parásitos, incluyendo el jugo de caña y conservas (Alarcón de Noya *et al.*, 2010).

Se han identificado varias glicoproteínas de superficie de *T. cruzi* involucradas en la invasión celular. Recientemente dos de estas glicoproteínas, denominadas gp82 y gp90, han adquirido especial importancia ya que se ha demostrado cómo su expresión modula la invasión de *T. cruzi* a la mucosa gástrica. Por otro lado, se ha demostrado la presencia de transcritos de estas dos glicoproteínas en epimastigotos y tripomastigotos metacíclicos durante la metaciclogénesis *in vivo* (Cordero *et al.*, 2008). Sin embargo, poco se sabe de los patrones de transcripción de dichos genes en tripomastigotos metacíclicos obtenidos *in vitro*.

En Costa Rica los estudios moleculares sobre *T. cruzi* son escasos. En el presente trabajo se determinó la expresión de la gp82 y gp90 mediante RT-PCR en tiempo real, en epimastigotos y tripomastigotos metacíclicos obtenidos *in vitro* de cepas costarricenses de *T. cruzi* para evaluar los patrones de expresión de dichas glicoproteínas, y así obtener una visión más completa de los factores que afectan el panorama global de la tripanosomiasis en Costa Rica.

B. ANTECEDENTES

Trypanosoma cruzi

En 1907, mientras estaba trabajando en la profilaxis de la malaria en Lassance, Brasil, el Dr. Carlos Chagas empezó a observar un grupo de pacientes cuya enfermedad no correspondía a ninguna de las etiologías conocidas en ese tiempo. Es entonces cuando descubre el *Trypanosoma cruzi* en triatominos y en la sangre de un gato. Seguidamente, lleva a cabo una serie de investigaciones en las cuales se describe la enfermedad, así como el parásito, los reservorios y vectores (Chagas, 1909).

Trypanosoma cruzi es un protozoo perteneciente al subreino Protozoa, filo Sarcomastigophora, subfilo Mastigophora, orden Kinetoplastida, suborden Trypanosomatina, familia Trypanosomatidae, género *Trypanosoma*, subgénero *Schizotrypanum*. Una cepa de *T. cruzi* se define como un aislamiento del parásito obtenido a partir de insectos vectores, mamíferos reservorios o seres humanos infectados de forma natural. Ésta suele estar compuesta por una población de parásitos genéticamente heterogénea (OMS, 2003).

T. cruzi posee tres formas morfológicas básicas: tripomastigoto, epimastigoto y amastigoto. Éstas se distinguen entre sí por la posición del cinetoplasto en relación al núcleo y por la presencia o ausencia de una membrana ondulante. El tripomastigoto posee el cinetoplasto posterior al núcleo, en la porción última del parásito, su flagelo sale del extremo posterior y se dobla hacia delante, formando una membrana ondulante a lo largo de todo el parásito y emerge en forma libre en su extremo anterior. El epimastigoto presenta el cinetoplasto en

la parte media, anterior al núcleo y el flagelo emerge de la parte media del parásito, formando una membrana ondulante más pequeña que la observada en los tripomastigotos. El amastigoto es esférico de ubicación intracelular, sin flagelo libre y el cinetoplasto se observa como un cuerpo oscuro cerca del núcleo. Los tripanosomátidos poseen un conjunto de microtúbulos (polímeros lineares de α y β tubulina) subpeliculares que se distribuyen en toda la membrana citoplásmica, excepto en el área donde emerge el flagelo (saco flagelar). Éstos se encuentran adosados a la membrana citoplásmica por el lado interno conformando un citoesqueleto periférico de gran rigidez. El cinetoplasto es una malla o red de ADN extranuclear localizada en un punto específico de la mitocondria y dependiendo de la especie de tripanosomátido, puede contener del 10 al 20% del ADN total celular. El ADN del kinetoplasto está estructurado por la concatenación de dos tipos de moléculas circulares de ADN: los minicírculos y los maxicírculos. Los primeros son moléculas circulares de ADN con una longitud de 100 a 2 500 pares de bases (pb) y forman la mayor parte de la estructura (5 000- 10 000 moléculas por célula). Éstos codifican instrucciones para ARN pequeños que participan en el procesamiento por edición de ARN mensajeros mitocondriales. Los maxicírculos son moléculas más grandes de ADN, con una longitud de 30 000- 50 000 pb. Éstos últimos se encuentran en menor número que los minicírculos (50 copias por célula) y representan el equivalente al ADN mitocondrial de otros eucariontes, pues codifican instrucciones para ARNs codificadores de proteínas, ARN ribosomales y de transferencia mitocondriales (Sousa, 1999).

La infección por *T. cruzi* es transmitida por triatomíneos a más de 100 diferentes especies de animales mamíferos salvajes y domésticos. Los triatomíneos se alimentan de sangre durante

la noche y adquieren el parásito al picar a un animal infectado, ingiriendo así los tripomastigotos. En el intestino del insecto los tripomastigotos se transforman en epimastigotos, los cuales constituyen el segundo estadio. Después de la reproducción a través de mitosis, los epimastigotos pasan a la ampolla rectal del vector donde se convierten en tripomastigotos metacíclicos. Éstos se evacúan a través de las heces y orina, pudiendo infectar a un nuevo hospedador. Los tripomastigotos metacíclicos entran en el organismo a través de excoriaciones de la piel (sitio de picada) o a través de las mucosas, invadiendo inmediatamente las células hospederas. Dentro de las células, los tripomastigotos pierden su flagelo y se redondean para formar amastigotos, los cuales se multiplican intracelularmente por fisión binaria. Cuando los amastigotos llenan la célula, se transforman en tripomastigotos, los cuales son liberados a los espacios intersticiales y al torrente sanguíneo. Éstos tiene la capacidad de infectar otras células, donde se transforman de nuevo en amastigotos, repitiéndose indefinidamente el ciclo de infección (Zeledón, 1996).

Los primeros estudios de las características biológicas de las cepas de *T. cruzi* con base en la morfología celular, virulencia, e histopatología en animales permitieron la agrupación de dichas cepas en tres grupos o biotipos denominados I, II y III (Andrade, 1985). Seguidamente estudios electroforéticos de isoenzimas de *T. cruzi* revelaron una importante variabilidad isoenzimática entre los aislamientos e identificaron tres grupos importantes de zimodemes: Z1, Z2, y Z3. Los zimodemes Z1 y Z3 predominan en el ciclo silvestre, mientras que el Z2 está relacionado con el ciclo doméstico (Miles *et al*, 1977).

-

El polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP) del ADN del cinetoplasto (ADNk) reveló que los aislamientos de *T. cruzi* poseen características heterogéneas que determinan varios grupos denominados esquizodemes (Morel *et al*, 1980). El RFLP de gen de ARN ribosómico (ARNr) 18S permitió la clasificación de *T. cruzi* en tres grupos denominados ribodemes I, II y III (Clark y Pung, 1994). Por otra parte los análisis de las secuencias génicas e intergénicas del ARNr revelaron dimorfismo entre las cepas de *T. cruzi*; la amplificación mediante PCR de una región del gen de ARNr 24S α produjo segmentos de 125 y 110 pares de bases que definían dos grupos principales de cepas que se denominaron linajes. Se observó una asociación del linaje 1 con el ciclo doméstico, y del linaje 2 con el selvático (Souto *et al*, 1996).

Con base en lo anterior, la nomenclatura de los dos grupos principales de *T. cruzi* de acuerdo con Guhl y Lazdins-Held, 2005 es:

- *T. cruzi* I, equivalente al Z1, linaje 2, unidad taxonómica discreta (DTU) 1, tipo III o ribodeme II/III.
- *T. cruzi* II, equivalente a Z2, linaje 1, DTU 2, tipo II o ribodeme I.

Vías de Transmisión

Numéricamente la transmisión por vectores es la más importante ya que es responsable de más del 80% de los casos. La principal especie de vector domiciliado en Costa Rica es *Triatoma dimidiata*. Colonias peridomiciliares de *T. dimidiata* encontradas en el pueblo de San Rafael de Heredia confirman la tendencia del insecto de infestar áreas urbanas cuando

las condiciones lo permiten. Los marsupiales, comunes en áreas urbanizadas, se convierten en animales sinantrópicos, uniendo el ciclo doméstico y silvestre de *T. cruzi*, con el *T. dimidiata* como vector en ambos casos (Zeledón *et al*, 2005). *Panstrongylus geniculatus* es la segunda especie selvática más frecuente en nuestro país, encontrándose principalmente en la provincia de Puntarenas y se asocia comúnmente a armadillos, roedores y marsupiales (Zeledón *et al*, 2001). *T. dispar* es la tercera especie selvática más común en nuestro país, generalmente encontrada a mayores altitudes (Chinchilla *et al*, 2009), seguida por *Panstrongylus rufotuberculatus*, la cual se encuentra en regiones con altitudes inferiores a los 800 metros sobre el nivel del mar (Calderón-Arguedas *et al*. 2004).

La transmisión congénita de la enfermedad de Chagas ocurre en mujeres embarazadas infectadas, cuando una lesión en la placenta favorece la penetración de *T. cruzi* hasta los vellos del corión, donde los amastigotos se multiplican probablemente en las células de Hofbauer e invaden la circulación fetal, con consecuencias como aborto, muerte intrauterina, niños prematuros y enfermedad de Chagas aguda. La enfermedad de Chagas congénita se caracteriza por fiebre, ictericia, anemia, crecimiento de bazo e hígado y lesiones cutáneas. También puede transmitirse por el canal de parto durante el nacimiento.

El riesgo de transmisión congénita varía según la cepa del parásito, la parasitemia de la madre, la existencia de lesiones en la placenta y la región geográfica (Coura, 2007).

Los movimientos migratorios de las zonas rurales a las zonas urbanas que ocurrieron en América Latina a partir de los años sesenta, cambiaron las características epidemiológicas tradicionales de la transmisión de *T. cruzi*, cobrando importancia la transmisión sanguínea de *T. cruzi*. El riesgo de transmisión sanguínea depende de varios factores epidemiológicos, así

como del grado de parasitemia del donante, el número y volumen de las transfusiones recibidas, el tiempo transcurrido entre la toma de sangre y la transfusión, y el estado inmunológico del receptor, entre otros. Actualmente, en la mayoría de los países de América Latina los bancos de sangre aplican pruebas a los donantes para prevenir dicha transmisión de *T. cruzi* (Dias y Schofield, 1999).

Existen casos de receptores de órganos de donantes con enfermedad de Chagas crónica que han sufrido enfermedad aguda y en cuya sangre se ha aislado el parásito. Esto ha ocurrido en transplantes de corazón, médula ósea, páncreas y riñón, siendo más frecuente en el último caso (OMS, 2003).

Los avances en el control de poblaciones de triatomíneos domésticos en América del Sur, particularmente en Brasil, han contribuido a la reducción de dicha vía de transmisión (Dias *et al*, 2008). En este escenario, y con el control de la transmisión sanguínea, la infección por vía oral se ha convertido en un mecanismo importante y persistente de transmisión, como se ha visto en microepidemias y brotes de enfermedad de Chagas aguda en varios países (Coura, 2006). La infección vía oral de *T. cruzi* puede ocurrir por ingestión de leche materna de madres chagásicas, carne cruda de animales infectados, alimentos contaminados con triatomíneos o sus heces y alimentos impregnados con secreciones de las glándulas anales de didélfidos (Pereira *et al*, 2009).

El primer brote de enfermedad de Chagas transmitida vía oral publicado ocurrió en Rio Grande do Sul, Brasil, en 1965, donde se reportaron 17 personas enfermas, de las cuales murieron 6, después de comer en el Colegio de Agricultura de la localidad (Silva *et al*, 1968). Entre 1982 y el 2001 se han reportado 28 microepidemias de enfermedad de Chagas

transmitida vía oral en Brasil, con un total de 149 personas infectadas. En una de estas microepidemias en Amapá específicamente, la transmisión se atribuyó a la ingestión de jugo de açai contaminado con las heces de triatomíneos (Coura *et al*, 2002). En el 2005 se reportó un brote asociado al consumo de jugo de caña contaminado, debido a la presencia de triatomíneos en los alrededores del quiosco donde se vendía dicho jugo (Pereira *et al*, 2009). En el 2006 se reportaron 94 nuevos casos de enfermedad de Chagas aguda por transmisión oral y en el 2007, un promedio de 10 nuevos casos por mes, lo que representa un incremento anual de 2,2 nuevos casos adquiridos vía oral por mes (Benchimol-Barbosa, 2010).

En Costa Rica se ha reportado la tripanosomiasis canina adquirida vía oral en diferentes lugares del país, incluyendo el Valle Central. Los vectores infectados vuelan a las casas atraídos por la luz y los perros los muerden. La infección vía oral ha demostrado ser más efectiva que la transmisión vectorial en perros de diversas razas (Montenegro *et al*, 2002).

Aspectos clínicos de la enfermedad de Chagas

La enfermedad de Chagas posee tres fases clínicas: la fase aguda, la fase indeterminada y la fase crónica. La mayoría de casos de enfermedad de Chagas aguda se detecta antes de los 15 años; sin embargo, ésta puede producirse en cualquier edad. La fase aguda inicia cuando *T. cruzi* entra al organismo y provoca una reacción cutánea local en el punto de entrada, denominada chagoma. Cuando la puerta de entrada ha sido la conjuntiva, ocurre un edema no doloroso en los párpados y los tejidos aledaños, además de adenitis

preauricular, que característicamente es unilateral conocido como el signo de Romaña. Los síntomas se presentan de 1 a 2 semanas después de adquirir la infección y se resuelven en 4 a 8 semanas. Éstos pueden incluir fiebre, anorexia, diarrea, inflamación de los ganglios, hepatomegalia, esplenomegalia y miocarditis. En pacientes inmunosuprimidos dicha fase puede ser fulminante, con daño cardíaco y del sistema nervioso central severo (OMS, 2003).

La forma indeterminada ocurre en el 60 a 70% de los pacientes, la mayoría entre los 20 y 50 años de edad. Dicha fase inicia de 8 a 10 semanas después de la infección y usualmente dura de 10 a 30 años e incluso toda la vida. La parasitemia disminuye hasta niveles indetectables, y hay presencia de anticuerpos IgG contra *T. cruzi*. La infección puede ser rápidamente activada durante una enfermedad severa o en condiciones de inmunosupresión severa (Umezawa *et al*, 2001).

La fase crónica se presenta en aproximadamente un 30% de los casos, generalmente de 10 a 30 años después de la infección inicial. Los problemas cardíacos son los más serios y se manifiestan principalmente como daño al tejido muscular y parasimpático del corazón y trastornos en la conducción de la señal eléctrica del corazón, lo que produce insuficiencia cardíaca y tromboembolias. La afectación gastrointestinal consiste en la dilatación del esófago (megaesófago) y del colon (megacolon), debido al daño local al sistema neuronal autónomo (Punukollu *et al*, 2007).

C. MARCO TEÓRICO

Las diferentes formas de *T. cruzi* expresan varias moléculas en su superficie que interactúan con componentes del hospedero para invadir las células. En 1983 Nogueira describió el efecto antifagocítico de la glicoproteína de superficie gp90 presente en tripomastigotos sanguíneos, utilizando macrófagos como la célula hospedera. Esta glicoproteína posee una actividad glicosidasa, por lo que ejerce un efecto antifagocítico al remover residuos de azúcar necesarios para la internalización del parásito, constituyendo un mecanismo de evasión a la internalización por células fagocíticas (Nogueira, 1983).

Para que se dé la internalización del parásito es necesaria la movilización intracelular de Ca^{2+} , tanto en el parásito como en la célula. En los tripomastigotos metacíclicos, la gp90 produce una repuesta de Ca^{2+} de muy baja intensidad, que no favorece su internalización (Ruiz *et al*, 1998). Por lo tanto, la gp90 modula de manera negativa la infección, ya que actúa como un inhibidor de la invasión celular (Málaga y Yoshida, 2001).

En 1986 se caracterizó, mediante anticuerpos monoclonales, una glicoproteína de superficie de 82 kDa presente en tripomastigotos metacíclicos de cuatro cepas de *T. cruzi* (CL, G, Y y Tulahuen). La glicoproteína gp82, junto con la gp35/50 son las principales glicoproteínas de superficie de los tripomastigotos metacíclicos. Se ha demostrado que son altamente inmunogénicas ya que ratones inmunizados con tripomastigotos metacíclicos inactivados con calor producen anticuerpos que reconocen estos antígenos y lisan los tripomastigotos metacíclicos (Teixiera y Yoshida, 1986).

La gp82 promueve la invasión celular ya que desencadena una cascada bidireccional de señales, llevando a la movilización de Ca^{2+} tanto dentro del parásito como en la célula hospedera (Ruiz *et al*, 1998). Durante esta cascada de señales, en el parásito se activa la tirosin kinasa y la fosforilación de la p175, así como la fosfolipasa C que lleva a la generación de inositol trifosfato (IP_3). Esto promueve la liberación de Ca^{2+} a partir del almacén intracelular sensible a IP_3 (Manque *et al*, 2000). En la célula hospedera, el fosfoinositol 3-kinasa y la protein kinasa C están involucradas en la cascada de señales que culmina con la movilización interna de Ca^{2+} y la consecuente desorganización del citoesqueleto de actina, lo que facilita la internalización del parásito (Cortez *et al*, 2006).

Tanto la gp82 como la gp90 están codificadas por una familia de genes parte de la superfamilia de las transialidasas/gp85 (gp85, Tc85, TSA-1, Tt34c1, SA85), las cuales están presentes en múltiples copias, distribuidas en varios cromosomas en el genoma. Esta familia de genes puede dividirse según los patrones de hibridización obtenidos con sondas derivadas de diferentes regiones de los genes de gp82 y gp90 (Carmo *et al*, 1999). El análisis de la secuencia de la gp90 revelaron un porcentaje de identidad de aminoácidos de 40 a 60% con la familia de las transialidasas/gp85. Por otro lado, la gp82 presentó un porcentaje de identidad a nivel de aminoácidos de 40 a 56% con la familia de las transialidasas/gp85 (Franco *et al*, 1993; Araya *et al*, 1994).

Un estudio realizado con cepas de Perú y Guatemala reveló tres grupos de genes gp82: A, B y C, mediante el análisis de múltiples clones de ADN a partir de PCR. Se observó un porcentaje de homología de 95 a 97% dentro de cada grupo y de 67-79% entre los grupos.

Es importante destacar que aunque la secuencia del sitio de unión varió entre los grupos, no hubo ninguna diferencia a nivel funcional (Songthamwat *et al*, 2007).

Con el desarrollo de un ADNc para la gp90 de la cepa G, aislada de una zarigüeya en la Amazonia, se determinó mediante transferencia de Northern Blot que dicho ADNc hibrida con un ARNm de 3 kb presente en las formas metacíclicas, mientras que la hibridación con el ARNm de los epimastigotos fue débil, y para los amastigotos fue negativa (Franco *et al*, 1993). Por otro lado, el desarrollo de un ADNc para la gp82 reveló que éste hibrida con un ARNm de 2.2 kb presente en tripomastigotos metacíclicos; no se detectó ninguna señal de hibridación en amastigotos, epimastigotos y tripomastigotos de cultivos (Araya *et al*, 1994). Estos análisis de transferencia de Northern y Western Blot demostraron que la gp82 y gp90 son preferencialmente transcritas y expresadas en el estadio de tripomastigotos metacíclicos. Estudios posteriores sobre la transcripción de dichos genes mediante PCR mostraron la presencia de transcritos de estas dos glicoproteínas en epimastigotos y tripomastigotos metacíclicos durante la metaciclogénesis *in vivo* (Cordero *et al*, 2008). Sin embargo, poco se sabe de los patrones de transcripción de dichos genes en tripomastigotos metacíclicos obtenidos mediante la inducción de la metaciclogénesis *in vitro*.

Al determinar la expresión de la gp82 y gp90 en epimastigotos y tripomastigotos metacíclicos obtenidos *in vitro* de cepas costarricenses de *T. cruzi* se pretende estudiar los patrones de transcripción de dichas glicoproteínas y evaluar la heterogeneidad de las cepas costarricenses de *T. cruzi*.

II. HIPÓTESIS

Las cepas costarricenses de *Trypanosoma cruzi* expresan los genes gp82 y gp90 *in vitro* que modulan la capacidad de invasión celular.

III. OBJETIVOS

Objetivo General

- Evaluar la expresión de las glicoproteínas gp82 y gp90 de *Trypanosoma cruzi* vinculadas con la invasión celular en cepas costarricenses del parásito mediante RT-PCR en tiempo real.

Objetivos Específicos

- Estimar la expresión de los transcritos para las glicoproteínas de superficie gp82 y gp90 en tripomastigotos metacíclicos inducidos “*in vitro*” de las cepas en estudio.
- Estimar la expresión de los transcritos para la gp82 y la gp90 en epimastigotos de cultivos de las cepas en estudio.
- Evaluar las características de patogenicidad de las cepas en estudio, mediante un modelo *in vivo*, y relacionarlas con la expresión de las glicoproteínas gp82 y gp90.
- Valorar la expresión de las glicoproteínas gp82 y gp90 como un criterio de heterogeneidad en *T. cruzi*.

IV. METODOLOGÍA

Cepas de *Trypanosoma cruzi* utilizadas

Se utilizaron cuatro cepas costarricenses de *Trypanosoma cruzi* facilitadas por la Dra. Idalia Valerio del Laboratorio de Investigación de la Universidad de Ciencias Médicas “Andrés Vessalio Guzmán” (UCIMED): TDIM/CR/2002/Santa Rita, aislada de *Triatoma dimidiata* de Santa Rita de Nandayure, Guanacaste; TRUF/CR/2004/Manuel Antonio, aislada de *Panstrongylus rufotuberculatus* del Parque Nacional Manuel Antonio; TDIM/CR/2005/Santo Domingo, aislada de *T. dimidiata* de Santo Domingo de Heredia; y TDIM/CR/2007/Desamparados, aislada de *T. dimidiata* de San Rafael Abajo de Desamparados. Las cepas se mantuvieron mediante pasajes en agar sangre 40% inclinado con Infusión de Cerebro Corazón al 3.7% (Tanuri *et al*, 1985).

Obtención de epimastigotos y tripomastigotos metacíclicos

Para la obtención de epimastigotos, se mantuvieron cultivos de cada cepa en la fase de crecimiento logarítmica, según la metodología descrita por Camargo (1964) modificada. Brevemente, se transfirió el volumen de parásitos para obtener una concentración final de 1×10^6 parásitos/mL en nuevos tubos de agar, a partir de un cultivo de 7 días. Se realizaron pasajes de 1.0 mL a un medio nuevo cada 48 horas durante 8 días. Se realizó una tinción de Giemsa en cada pasaje para determinar el porcentaje de epimastigotos. Se utilizaron para realizar la extracción de ARNm los cultivos con un 100% de epimastigotos.

Los tripomastigotos metacíclicos se obtuvieron por inducción de la metacicloogénesis *in vitro* según la metodología descrita por Contreras y colaboradores (Contreras *et al*, 1985) con algunas modificaciones. Se inocularon 1×10^8 epimastigotos procedentes de la fase de crecimiento logarítmico, previamente centrifugados a 8 500 gravedades por 25 minutos a 10°C, en 5.0 mL de orina artificial de triatomino (OAT) (NaCl 190 mM, KCl 17 mM, CaCl₂ 2 mM, MgCl₂ 2 mM, solución amortiguadora de fosfatos 8 mM, pH 6.0) en botellas de cultivo celular de 25 cm². Éstas se incubaron a 28°C por 2 horas. Seguidamente, se concentraron los parásitos mediante centrifugación en tubos cónicos a 8 500 gravedades por 25 minutos 4°C, y se resuspendieron en 5.0 mL de OAT suplementado con L-prolina 10 mM, en botellas de cultivo celular de 25 cm². Las botellas se incubaron a 28°C por 96 horas. Una vez concluido el período de incubación, se procedió a centrifugar el contenido de las botellas en tubos cónicos a 8 500 gravedades por 30 minutos a 10°C.

Los tripomastigotos metacíclicos se purificaron mediante una cromatografía de intercambio de iones en una columna de DEAE-Sepharosa, empacada en una jeringa de 10 mL sobre una capa de lana de vidrio y papel filtro, utilizando un tampón de fosfatos (pH 8.0, fuerza iónica 0.362) con glucosa a una concentración de 0.5% (p/v) (PGS 5:5), según la metodología descrita por Sousa (1983) modificada. La columna se equilibró con pasajes de 15.0 mL de PS y 15.0 mL de PGS 5:5. El botón de parásitos se resuspendió en 1.0 mL de PGS 5:5 y se colocó en la columna. Seguidamente se pasaron por ésta 15.0 mL de PGS 5:5 y 15.0 mL de PGS 6:4. El eluido se recolectó en alícuotas de 5.0 mL y se centrifugó a 8 500 gravedades por 30 minutos a 10°C. Se verificó la pureza del eluido mediante una

tinción de Giemsa del botón generado a partir de dicho eluido, y se determinó la concentración de parásitos mediante un conteo en una cámara de Neubauer. Debido a que los tripomastigotos metacíclicos tienen una carga negativa similar a la de los tripomastigotos sanguíneos, y los epimastigotos presentan una carga negativa menor, al pasar la mezcla por la columna de DEAE Sepharosa cargada negativamente, los tripomastigotos se eluyen mientras que los epimastigotos se mantienen unidos a la columna (Alvarenga y Brener, 1979). Los tripomastigotos metacíclicos se conservaron a 10°C para la posterior extracción de ARNm.

Extracción de ARN

Se realizó la extracción de ARN total a partir de 1×10^7 epimastigotos y tripomastigotos metacíclicos respectivamente mediante el kit Maxwell®16 Cell LEV Total RNA Purification Kit (# AS 1225, Promega, USA) según las instrucciones del fabricante, en el equipo Maxwell®16 System (Promega). Se determinó la concentración estimada de ARN mediante el Nucleic dotMetric Assay (Gbiosciences, USA).

PCR en Tiempo Real

El RT-PCR se basa en la aplicación de dos actividades enzimáticas separadas: primero la generación de una molécula de ADN complementaria al ARN blanco (ADNc), mediante una ADN polimerasa ARN dependiente; y la posterior amplificación del ADNc, mediante una ADN polimerasa ADN dependiente. El PCR en tiempo real es un método cuantitativo que monitorea una señal fluorescente emitida durante la reacción de amplificación de una

secuencia blanco. Esta emisión es un indicador de la producción del amplicón en cada ciclo del PCR y es detectada por el termociclador que la cuantifica en cada ciclo de amplificación (Bustin, 2004).

La síntesis de ADNc se realizó mediante el kit RevertAid™ H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit (K#1631, Fermentas, Canada) utilizando 4 µL de ARN de cada muestra, de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Para el RT-PCR en tiempo real se tomaron 2 µL del ADNc, 200 nM de iniciadores y 20µL de SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, USA). El ADNc para la gp82 se amplificó con los iniciadores F82qRT 5'-TGC CTC CTT CTC CGC TTCT'3 y R82qRT 5'-CGC TGG CCG AAT TGG A-3', según las secuencias de oligonucleótidos del gen gp82 (número de acceso de GenBank L14824.1, Araya *et al.*, 1994). El ADNc de la gp90 se amplificó con los iniciadores ABI9F 5-TCA TGC GGT CGA TCT ATT TTT G-3' y ABI9R 5'-AAT GCT TCC CTC GTA GTC TCT TGA-3', según las secuencias de oligonucleótidos del gen gp90 (número de acceso de GenBank AF426132.1). Se utilizó como gen constitutivo la gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH), cuyo ADNc se amplificó con los siguientes iniciadores: ABIGF 5'-AGCGCGCGTCTAAGACTTACA-3' y ABIGR 5'-TGGAGCTGCGGTTGTCATT-3'. Las reacciones se llevaron a cabo en un ABI Prism 7500 (Applied Biosystems) y se analizaron con el software ABI Prism 7500 SDS versión 2.0 utilizando el protocolo estándar.

El umbral se define como el punto donde el sistema detecta un cambio en la fluorescencia 10 veces mayor que la media de la desviación estándar del ruido de fondo. El Ct

(Threshold cycle) es el número de ciclos que se requieren para que la señal fluorescente supere dicho umbral. Se realizó una cuantificación relativa comparando los niveles de expresión de los genes gp82 y gp90 respecto al gen constitutivo, mediante la razón de expresión respecto al GAPDH (Babu, 2004).

Los resultados se analizaron mediante el método $2^{-\Delta\Delta C_t}$ que permite analizar cambios en la expresión de los genes respecto a otro. Para corregir las variaciones entre las muestras se analiza un gen constitutivo junto con las muestras, que sirve como referencia interna contra el cual se normalizan los demás valores para poder comparar los datos y determinar la expresión relativa respecto a un gen (Livak y Schmittgen, 2001).

Infección en Ratones

Con el fin de valorar las características de patogenicidad, para cada cepa se inocularon por vía intraperitoneal 3 ratones C3H machos de 15 g de peso, con 1×10^7 tripomastigotos metacíclicos obtenidos a partir de la diferenciación *in vitro*. Dichos ratones fueron sangrados de la cola trisemanalmente por un período de 30 días, con el fin de observar el comportamiento de la parasitemia y relacionar estos aspectos con las expresión de las glicoproteínas gp82 y gp90.

V. RESULTADOS

Al realizar pasajes de cultivos cada 48 horas se mantuvo la fase de crecimiento logarítmico de los epimastigotos y no se observó un incremento de las formas metacíclicas. En el tercer pasaje se observaron alrededor de un 5% de tripomastigotos metacíclicos para la cepa Santa Rita, un 2% para las cepas Manuel Antonio y Santo Domingo, y un 1% para la cepa Desamparados. En el cuarto pasaje no se observaron tripomastigotos metacíclicos en ninguna de las cepas, por lo que se escogieron dichos cultivos para realizar la extracción de ARNm.

Para la inducción de la metaciclogénesis, el porcentaje de tripomastigotos metacíclicos obtenidos a las 96 horas fue variable para cada cepa. La cepa Santa Rita y Desamparados presentaron los menores porcentajes, alrededor de 30%, mientras que las cepas Manuel Antonio y Santo Domingo presentaron porcentajes de 45%. Al pasar la mezcla de epimastigotos y tripomastigotos metacíclicos por la columna de DEAE-Sepharosa, se logró una mejor separación de los tripomastigotos utilizando el PGS 5:5.

Se logró extraer el ARN de 1×10^7 epimastigotos y tripomastigotos metacíclicos, en concentraciones estimadas de $0.007 \mu\text{g}/\mu\text{L}$. Por otro lado, las concentraciones estimadas de ADNc fueron de $0.125 \mu\text{g}/\mu\text{L}$. Los valores de Ct obtenidos en el PCR tiempo real para las glicoproteínas gp82, gp90 y GAPDH se muestran en la figura 1 y el cuadro 1. Cuanto menor sea el número de ciclos necesarios para llegar a un nivel de fluorescencia por encima del umbral de detección, mayor es la cantidad inicial de copias del gen en estudio. De manera que el Ct es inversamente proporcional a la cantidad de ARNm en la muestra.

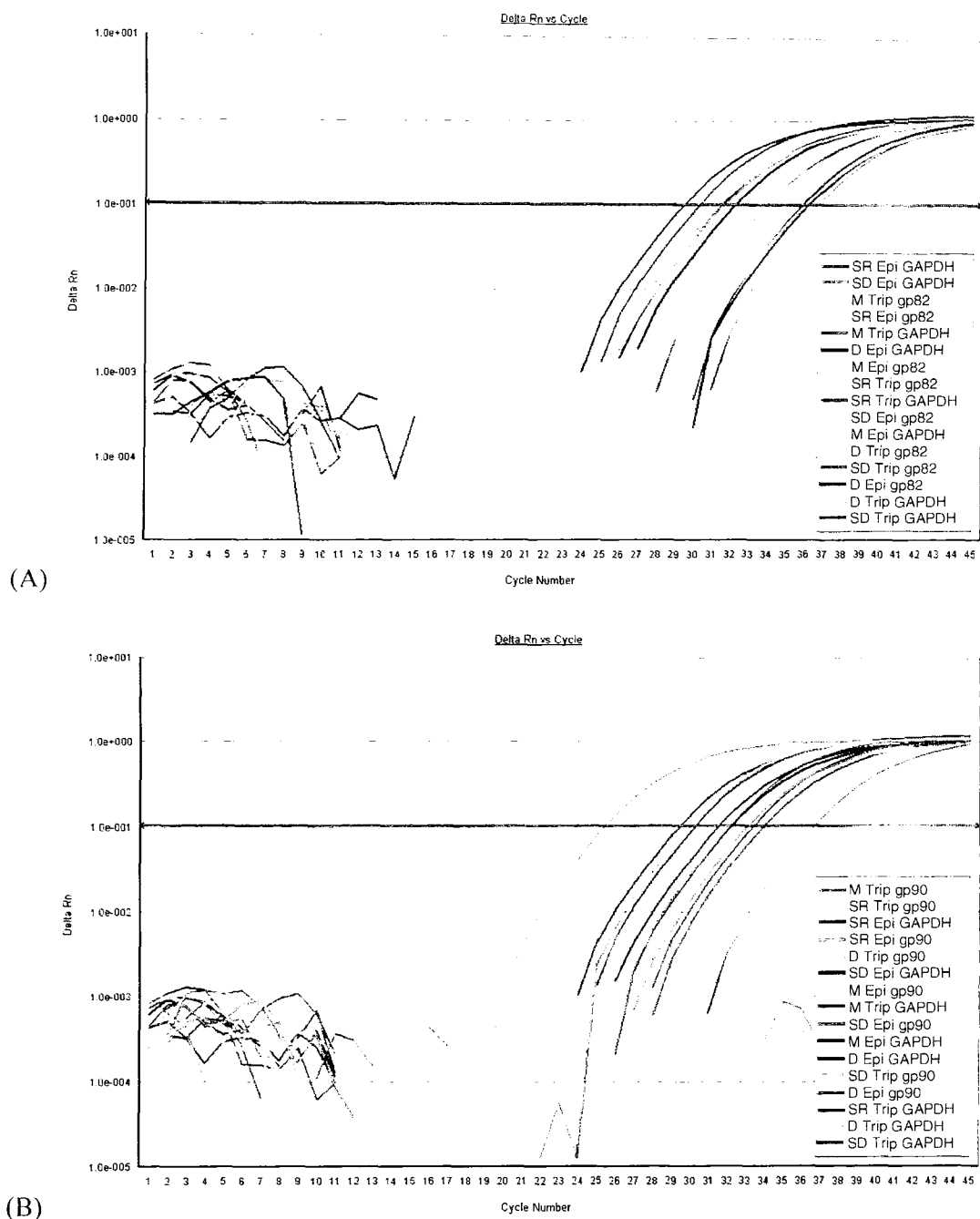


Figura 1. Curva de RT-PCR en tiempo real, ΔRn vs Número de Ciclo, obtenida para las cuatro cepas de *Trypanosoma cruzi* en estudio. SR: cepa Santa Rita; M: cepa Manuel Antonio; SD: cepa Santo Domingo; D: cepa Desamparados; Epi: epimastigotos; Trip: tripomastigotos metacíclicos. (A) Glicoproteína gp82 y GAPDH, en orden de Ct creciente; (B) Glicoproteína gp90 y GAPDH, en orden de Ct creciente.

En los epimastigotos de las cuatro cepas la razón de expresión de las glicoproteínas gp82 y gp90 respecto a la GAPDH fue menor a 1.00. La cepa Santa Rita presentó una razón de expresión de la gp82 respecto al gen constitutivo de 0.93, siendo la mayor respecto a las demás cepas. Mientras que para la gp90, la cepa Manuel Antonio presentó la mayor razón de expresión respecto al GAPDH, siendo de 0.99. En todos los casos, la razón de expresión de la gp90 fue mayor que la razón de la gp82 (Figura 2).

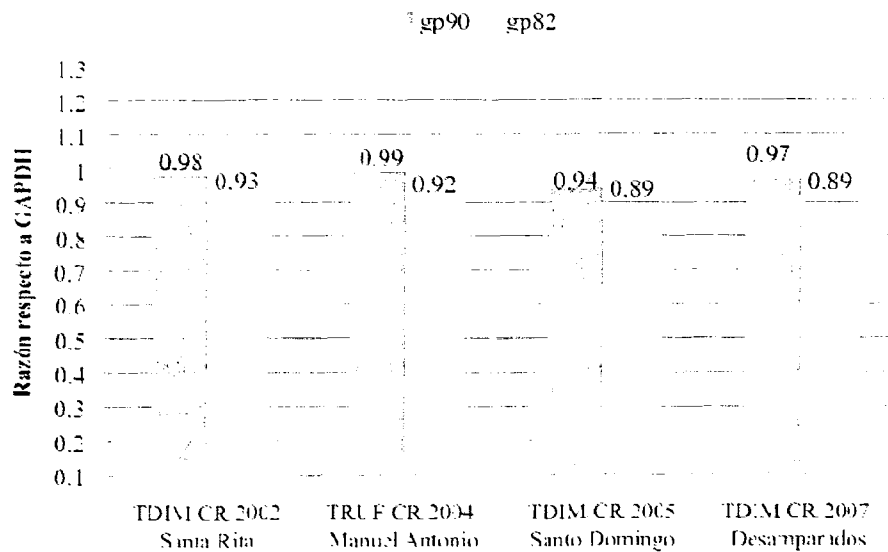


Figura 2. Razón de expresión de ARNm de las glicoproteínas gp82 y gp90 respecto a la GAPDH en los epimastigotos de las cepas de *T. cruzi* en estudio.

Para los tripomastigotos de las cuatro cepas en estudio la expresión de la gp82 respecto al gen constitutivo fue mayor a 1.00, siendo mayor en la cepa Santo Domingo (1.04). La razón de expresión de la gp90 para la cepa Santa Rita fue de 0.90, mientras que en las demás cepas fue mayor a 1.00. La cepa Manuel Antonio presentó la mayor razón de

expresión de la gp90 respecto al gen constitutivo. En general, la razón de expresión de ambas glicoproteínas respecto al gen constitutivo fue mayor en los tripomastigotos metacíclicos que en los epimastigotos (Figura 3).

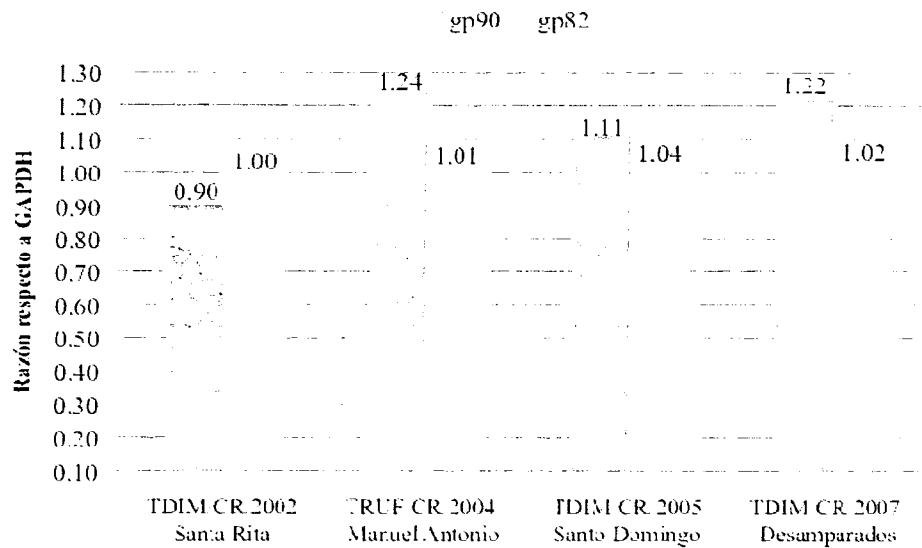


Figura 3. Razón de expresión de ARNm de las glicoproteínas gp82 y gp90 respecto a la GAPDH en los tripomastigotos metacíclicos obtenidos *in vitro* de las cepas de *T. cruzi* en estudio.

Mediante el método $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (Livak y Schmittgen, 2001) se comparó la expresión de ambas glicoproteínas en las dos formas del parásito, posterior a la normalización de los valores de Ct con el gen constitutivo (GADPH). En el cuadro 1 se muestra la normalización de los valores de Ct de acuerdo con el método. La expresión normalizada de gp82 ($2^{-\Delta\Delta C_t}$ gp82) y gp90 ($2^{-\Delta\Delta C_t}$ gp90) de los tripomastigotos respecto a los epimastigotos se muestran en la Figura 4.

Cuadro 1. Normalización de los valores de Ct de ARNm de las glicoproteínas gp82 y gp90 de las cepas de *T. cruzi* en estudio.

CEPA		Ct gp82	Ct gp90	Ct GAPDH	$\Delta Ct_{gp82} =$ $Ct_{gp82} -$ Ct_{GAPDH}	$\Delta Ct_{gp90} =$ $Ct_{gp90} -$ Ct_{GAPDH}	$\Delta \Delta Ct_{gp82epis} =$ $\Delta Ct_{gp82} -$ $\Delta Ct_{gp82epis}$	$\Delta \Delta Ct_{gp90epis} =$ $\Delta Ct_{gp90} -$ $\Delta Ct_{gp90epis}$
TDIM/CR/ 2002/ Santa Rita	Epimastigotos	31.65	30.09	29.46	2.19	0.63	0.00	0.00
	Tripomastigotos	34.10	37.72	34.00	-3.62	3.72	-5.81	3.09
TRUF/CR/ 2004/Manuel Antonio	Epimastigotos	33.49	31.09	30.74	2.75	0.35	0.00	0.00
	Tripomastigotos	31.36	25.40	31.56	-0.20	-6.16	-2.95	-6.51
TDIM/CR/ 2005/Santo Domingo	Epimastigotos	34.06	32.18	30.27	3.79	1.91	0.00	0.00
	Tripomastigotos	35.36	33.16	36.73	-1.37	-3.57	-5.16	-5.48
TDIM/CR/ 2007/ Desamparados	Epimastigotos	36.20	33.41	32.25	3.95	1.16	0.00	0.00
	Tripomastigotos	36.05	30.09	36.80	-0.75	-6.71	-4.70	-7.87

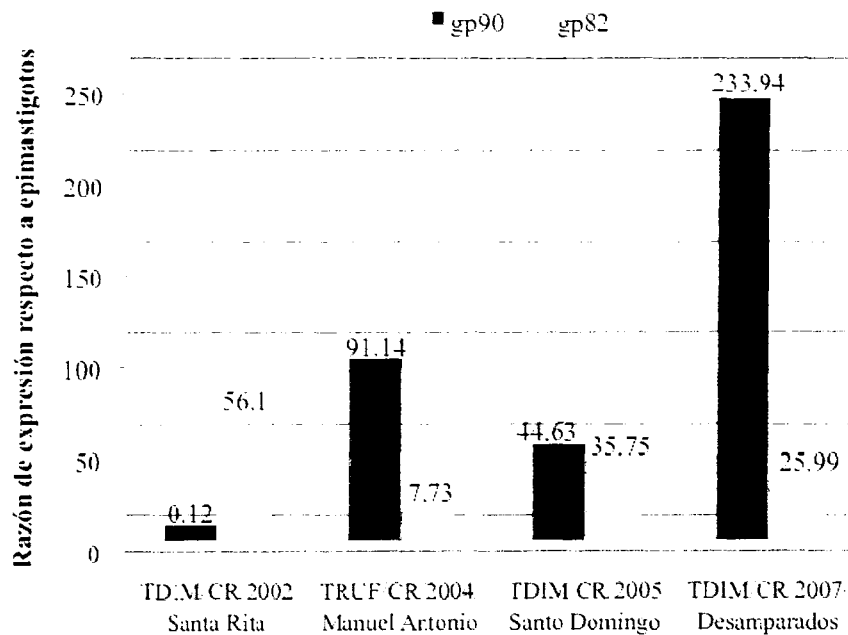


Figura 4. Razón de la expresión normalizada de ARNm de las glicoproteínas gp82 y gp90 de los tripomastigotos metacíclicos obtenidos *in vitro* respecto a los epimastigotos de las cepas de *T. cruzi* en estudio.

Los tripomastigotos metacíclicos de las cuatro cepas en estudio expresan ambas glicoproteínas en mayor cantidad que los epimastigotos (Figura 4). Los tripomastigotos de la cepa Santa Rita expresan 56.10 veces más la gp82 que los epimastigotos, mientras que la expresión de la gp90 es similar. En los tripomastigotos de la cepa Manuel Antonio la expresión de la gp82 y gp 90 es 7.73 y 91.14 veces mayor, respectivamente, que en los epimastigotos. Los tripomastigotos de la cepa Santo Domingo expresan 35.75 veces más la gp82 que los epimastigotos, mientras que la expresión de la gp90 es 44.63 veces mayor. Finalmente, en los tripomastigotos de la cepa Desamparados la expresión de la gp82 es 25.99 veces mayor que en los epimastigotos, y la de la gp90, es 233.94 veces mayor

La infección de las cepas de *T. cruzi* en ratones no permitió observar parásitos en sangre. A los 15 días, los ratones correspondientes a las cepas Santo Domingo y Desamparados murieron, por lo que se les procedió a extraer el corazón, el cual fue conservado en formalina al 10% y examinado por el Dr. Luis Alberto Morales del Laboratorio de Patología, Escuela de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional. En el miocardio de ratones de la cepa Santo Domingo se observó un leve infiltrado mononuclear perivascular y entre las fibras del miocardio, y escasos nidos chagásicos (Figura 5). En los corazones de los ratones de la cepa Desamparados también se observó un leve infiltrado mononuclear entre las fibras del miocardio, con escasos nidos chagásicos.

Para la cepa Manuel Antonio se observó una mortalidad de 2 de los 3 ratones, mientras que para la cepa Santa Rita sólo murió uno de los ratones. Debido a que los ratones de estas últimas dos cepas que fallecieron lo hicieron durante el fin de semana, el estado de

descomposición en el momento en que se verificó la muerte de los animales no permitió la obtención de material adecuado para el análisis histopatológico.



Figura 5. Hallazgos histopatológicos en ratón C3H de 15 g de peso infectado con la cepa TDIM/CR/2005 Santo Domingo, vía intraperitoneal. Se observa infiltrado mononuclear y un nido chagásico. Tinción con Hematoxilina Eosina.

VI. DISCUSIÓN

En la interacción de *T. cruzi* con la célula se distinguen tres etapas: la adhesión a la célula y el reconocimiento, la señalización y la invasión. En el estudio de dicha interacción se deben considerar la cepa en estudio, la forma del parásito y el tipo de célula hospedera, por lo que los mecanismos involucrados son complejos. Dentro de las moléculas de superficie involucradas en la adhesión y que además intervienen en la señalización, están las glicoproteínas gp82 y gp90 (Souza, Carvalho y Santos, 2010), que fueron sujeto de estudio en esta investigación.

En los epimastigotos, los Cts para el gen constitutivo fueron menores que los Cts de la gp82 y gp90. Esto indica que sí hay expresión de ambas glicoproteínas, aunque es menor que la expresión del gen constitutivo. La razón de expresión de la gp90 siempre fue mayor que la razón de expresión de la gp82, esto concuerda con la incapacidad de infección activa observada en los epimastigotos, ya que la gp90 inhibe la entrada del parásito a la célula. Al expresar poca gp82 la movilización intracelular de calcio no sería suficiente para que se dé la infección de la célula. Sin embargo, se ha propuesto que en los epimastigotos los transcritos de dichos genes no son traducidos o que dichas glicoproteínas son destruidas, ya que no fue posible detectarlas por medio de anticuerpos (Cordero *et al*, 2008). En un estudio realizado los tripomastigotos metacíclicos mostraron mecanismos que estabilizan el ARNm de la gp82, mientras que los epimastigotos poseen mecanismos que lo desestabilizan. Dichos mecanismos pueden estar mediados por elementos presentes en la región 3'-UTR de los transcritos. En dicho estudio se demostró además la movilización

del ARNm de la gp82 a los polisomas y su traducción únicamente en los tripomastigotos metacíclicos (Gentil *et al.*, 2009).

En el presente estudio, los tripomastigotos metacíclicos mostraron una razón de expresión de la gp82 respecto a la GAPDH mayor a 1, es decir, dicha glicoproteína se expresa más que el gen constitutivo. La expresión de la gp90 fue mayor a 1 para la mayoría de las cepas, excepto para la cepa Santa Rita que fue menor a 1. Estos resultados concuerdan con la capacidad de los tripomastigotos metacíclicos de invadir la célula y producir infección. Sin embargo, en el proceso de adhesión a la célula también intervienen otras moléculas de superficie como las mucinas (Di Noia, Sánchez y Frasch, 1995), la penetrina (Ortega-Barria y Pereira, 1991) y la Tc85/gp85 (Colli, 2008). De igual manera, son importantes otras moléculas que además de estar involucradas en la adhesión intervienen en la señalización, como la gp83 (Villalta *et al.*, 2001), la gp35/50 (Mortara *et al.*, 1992), la cruzipaina (Souto-Padrón *et al.*, 1990; Scharfstein *et al.*, 2000) y la oligopeptidasa B (Caler, 1998). De manera que la capacidad de invasión celular y por lo tanto, de producir infección no dependen únicamente de la expresión de las dos glicoproteínas estudiadas.

Al comparar la expresión de ambas glicoproteína entre las dos formas del parásito, ésta fue mayor en los tripomastigotos metacíclicos que los epimastigotos, lo cual concuerda con la mayor capacidad infectante de los tripomastigotos metacíclicos respecto a los epimastigotos (Souza, Carvalho y Santos, 2010). Se observaron diferencias en los patrones de expresión de estas formas en relación a los epimastigotos para las cuatro cepas. En los tripomastigotos metacíclicos de la cepa Santa Rita la expresión de la gp82 fue la más alta,

respecto a los epimastigotos, y la expresión de la gp90 es baja. Esto sugiere que la expresión de ambas glicoproteínas favorecerían la invasión celular.

En los tripomastigotos metacíclicos de la cepa Manuel Antonio, la diferencia de expresión de la gp82 respecto a los epimastigotos fue menor (7.73), mientras que la diferencia de expresión de la gp90 es considerable, siendo mayor en los primeros. Esto llevaría a pensar que dicha cepa tendría una menor capacidad de invadir la célula, sin embargo es necesario realizar modelos de infección *in vivo* para valorar su capacidad de producir infección.

En los tripomastigotos metacíclicos de la cepa Santo Domingo, la razón de expresión de gp82 respecto a los epimastigotos fue la segunda más alta. Esto explicaría la mayor capacidad de producir infección en ratones que mostró esta cepa, respecto a las demás cepas estudiadas. De manera que, la mayor expresión de la glicoproteína gp82 en los tripomastigotos metacíclicos de esta cepa podría explicar lo observado en los modelos de infección con ratones *in vivo*.

Para la cepa Desamparados, la expresión de la gp82 en los tripomastigotos metacíclicos es 25 veces mayor que en los epimastigotos, siendo aún mayor la expresión de la gp90. Esta cepa también produjo la muerte de los ratones infectados a pesar de la alta expresión de la gp90, lo que sugiere que otros mecanismos de infección podrían verse vinculados.

Los resultados obtenidos con el RT-PCR en tiempo real confirman la heterogeneidad clonal observada en las cepas de *T. cruzi* (Tibayrenc y Ayala, 1987). Las diferencias observadas en la expresión de la gp82 y la gp90 reflejan un comportamiento no homogéneo de los patrones de expresión de las glicoproteínas, así como de su capacidad de invasión a la célula, siendo la expresión de transcritos de ambas glicoproteínas diferentes para cada cepa.

La expresión de la gp82 y gp90 en las cepas costarricenses de *T. cruzi* podría favorecer su transmisión por vía oral, ya que se ha demostrado que estas glicoproteínas modulan la capacidad de infección a la mucosa gástrica. Las cepas de *T. cruzi* que expresan la gp82 pueden invadir la mucosa gástrica eficientemente, mientras que las cepas deficientes en gp82 invaden la mucosa gástrica mediante la gp30 (Yoshida, 2009). No obstante, debido a que la gp30 tiene baja afinidad por la mucina gástrica, se produce una menor parasitemia ya que sólo unos cuantos parásitos logran invadir eficientemente las células. A diferencia de la gp82 y gp30, la gp90 posee isoformas susceptibles a la digestión péptica en el estómago. De manera que, una cepa que exprese gp90 resistente a la pepsina va a presentar una menor infectividad a la mucosa gástrica: mientras que si la gp90 es susceptible a la digestión péptica a pH ácido, la cepa puede ser altamente infectante luego de que se expone al contenido gástrico (Yoshida, 2009). En este contexto de la transmisión por vía oral, la cepa Santa Rita sería la mejor facultada para invadir la mucosa gástrica, debido a la alta expresión de gp82 y baja expresión de gp90. La cepa Manuel Antonio por otro lado, sería la menos facultada para producir infección de la mucosa gástrica. Sin embargo, para obtener un panorama más completo de la transmisión oral de estas cepas, queda aún por estudiar la susceptibilidad a la pepsina gástrica de las isoformas de gp90 expresadas y estudiar su capacidad de infección por vía oral en modelos *in vivo*.

La capacidad de infección de los tripomastigotos sanguíneos, tripomastigotos de cultivo y de insecto de cepas costarricenses de *T. cruzi* a través de 6 rutas diferentes ha sido estudiada mediante un modelo animal murino, en el cual se infectaron ratones con tripomastigotos de tres diferentes fuentes a través de piel intacta, piel escarificada, vía oral,

vía anal, ocular y subcutánea. En dicho estudio las formas sanguíneas fueron las menos infectantes, mientras que las formas en el insecto presentaron la mayor capacidad de infección (Zeledón *et al.* 1977). A partir de dicho estudio y con el desarrollo de nuevos métodos como el PCR en tiempo real, es importante estudiar la expresión de la gp82 y gp90 en los tripomastigotos metacíclicos de triatomíneos para determinar diferencias en los patrones de expresión respecto a los tripomastigotos metacíclicos obtenidos *in vitro*. En el estudio realizado por Cordero y colaboradores (2008) se analizó la expresión de la gp82 y gp90 mediante RT-PCR de metacíclicos obtenidos de las heces de triatómino. Sin embargo, no se realizó ninguna separación de los epimastigotos y tripomastigotos metacíclicos presentes en el recto del vector, de manera que no se puede asegurar que el ARNm expresado sea exclusivamente de las formas metacíclicas. En vista de que los epimastigotos también expresan ARNm de estas dos glicoproteínas, es necesario realizar la separación de las formas para obtener datos más certeros sobre la expresión de estas glicoproteínas en los tripomastigotos metacíclicos presentes en el vector. Por otro lado, el estudio de la expresión de dichas glicoproteínas en los tripomastigotos sanguíneos ayudaría a aclarar el panorama de la transmisión a humanos y animales a través de la ingesta de carne de animales infectados.

En la actualidad se está estudiando el desarrollo de una vacuna contra *T. cruzi* utilizando un anticuerpo contra la gp82. La opsonización de las formas metacíclicas con el anticuerpo redujo su capacidad infectante, y la vacunación intranasal con un anticuerpo recombinante contra la gp82 indujo una respuesta inmune protectora en la infección a través de mucosas en un modelo murino (Eickhoff *et al.*, 2010).

El protocolo de PCR en tiempo real, utilizado en la presente investigación, es un método específico, preciso y altamente sensible debido a que puede detectar un bajo número de copias del ADNc del respectivo ARNm. Sería importante realizar, paralelo a los estudios con RT-PCR, ensayos que detecten las glicoproteínas estudiadas ya traducidas en la superficie de los epimastigotos y tripomastigotos metacíclicos.

A partir del presente trabajo se puede concluir que tanto los epimastigotos como los tripomastigotos metacíclicos obtenidos *in vitro* de las cepas costarricenses de *T. cruzi* expresan ARNm de las glicoproteínas en estudio. Dicha expresión podría estar regulada por mecanismos post-transcripcionales y post traduccionales en estudio (Gentil *et al*, 2009). Sin embargo, para tener un panorama más claro de cómo la expresión de las glicoproteínas gp82 y gp90 afecta la capacidad de invasión celular se deben llevar a cabo estudios con modelos de ratones *in vivo* así como ensayos con anticuerpos específicos para dichas glicoproteínas.

VII. BIBLIOGRAFÍA

- Alarcón de Noya, B., Díaz-Bello, Z., Colmenares, C., Ruíz-Guevara, R., Mauriello, L., Zavala-Jaspe, R., Suarez, J.A., Abate, T., Naranjo, L., Paiva, M. *et al.* (2010). Large urban outbreak of orally acquired acute chagas disease at a school in Caracas, Venezuela. *J. Infectious Diseases* 201, 1308-1315
- Alvarenga, N. y Brener, Z. (1979). Isolation of pure metacyclic trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi* from triatomine bugs by use of DEAE-Cellulose column. *Journal of Parasitology* 65. 814-815.
- Andrade, S. (1985). Morphological and behavioural characterization of *Trypanosoma cruzi* strains. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop* 18, 39-46.
- Araya, J., Cano, M., Yoshida, N., y Silveira, J. (1994). Cloning and characterization of a gene for the stage-specific 82-kDa surface antigen of metacyclic trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi*. *Mol. Biochem. Parasitol* 65, 161-169.
- Babu, M. (2004). Introduction to microarray data analysis. En *Computational Genomics: Theory and Application*, R.P. Grant, ed. (Norwich: Horizon Press), pp. 228-230.
- Benchimol-Barbosa, P. (2010). Further comments on oral transmission of Chagas disease in Brazil: Epidemiology, geographical distribution and viability of the infective parasite. *Int. Journal of Cardiology* 141, 203-204.
- Bustin, S. (2004). *A-Z of Quantitative PCR*. (California: International University Line).
- Calderón-Arguedas, O., Troyo, A., y Chinchilla, M. (2004). Infección natural de

- Panstrongylus rufotuberculatus* con *Trypanosoma cruzi* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) en Costa Rica. *Parasitología Latinoamericana* 59, 65-67.
- Caler, E., Vaena de Avalos, S., Haynes, P., Andrews, N. y Burleigh, B. (1998). Oligopeptidase B-dependent signaling mediates host cell invasion by *Trypanosoma cruzi*. *EMBO Journal* 17, 4975-4986.
- Calvo, N., Zeledón, R., Barboza, M., Sánchez, G., y Navas, L. (2003). Encuesta serológica y entomológica para la enfermedad de Chagas en Costa Rica, 2001-2001. *Boletín INCIENSA* 15, 4-5.
- Camargo, E. (1964). Growth and differentiation in *Trypanosoma cruzi*; I. Origin of metacyclic trypanosomes in liquid media. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo* 6, 93-100.
- Carmo, M., Araya, J., Ramirez, M., Boscardin, S., Cano, M., Baida, R., Ruiz, R., Santos, M.R., Chiurillo, M., Ramirez, J., *et al.* (1999). Organization and Expression of a Multigene Family Encoding the Surface Glycoproteins of *Trypanosoma cruzi* Metacyclic Trypomastigotes Involved in the Cell Invasion. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 94, 169-171.
- Chagas, C. (1909). Nova tripanozomiaze humana. Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi*. *Mem. Inst Oswaldo Cruz* 1: 159-218.
- Chinchilla, M., Castro, A., Reyes, L., Guerrero, O., Calderón, O. y Troyo, A. (2006). Enfermedad de Chagas en Costa Rica: Estudio comparativo en dos épocas diferentes. *Parasitología Latinoamericana* 61, 138-145.
- Chinchilla, M., Valerio, I. y Sánchez, R. (2009). *Triatoma dispar* nuevo transmisor silvestre

- de *Trypanosoma cruzi* en Costa Rica: su implicación en la epidemiología de la Enfermedad de Chagas. *Rev. Ibero-Latinoam. Parasitol* 68, 137-141.
- Clark, C. y Pung, O. (1994). Host specificity of ribosomal DNA variation in sylvatic *Trypanosoma cruzi* from North America. *Mol Biochem Parasitol* 66, 175-179.
- Colli, W. y Alves, M. (2008). Role of the gp85/trans-sialidae superfamily of glycoproteins in the interaction of *Trypanosoma cruzi* with host structures. *Sub-Cellular Biochemistry* 47, 58-69.
- Conteh, L., Engels, T. y Molyneux, D. (2010). Socioeconomic aspects of neglected tropical diseases. *Lancet* 375, 239–247.
- Contreras, V., Salles, J., Thomas, N., Morel, C. y Goldenberg, S. (1985). *In vitro* differentiation of *Trypanosoma cruzi* under chemically defined conditions. *Molecular and Biochemical Parasitology* 16, 315-327.
- Cordero, E., Gentil, L., Crisante, G., Ramírez, J., Yoshida, N., Añez, N. y Silveira, J. (2008). Expression of GP82 and GP90 surface glycoproteins genes of *Trypanosoma cruzi* during *in vivo* metacyclogenesis in the insect vector *Rhodnius prolixus*. *Acta Tropica* 105, 87-91.
- Cortez, M., Atayde, V. y Yoshida, N. (2006). Host cell invasion mediated by *Trypanosoma cruzi* surface molecule gp82 is associated with F-actin disassembly and is inhibited by enteroinvasive *Escherichia coli*. *Microbes Infect* 8, 1502-1512.
- Coura, J. (2006). Transmission of chagasic infection by oral route in the natural history of Chagas disease. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop* 39, 113-117.

- Coura, J. (2007). Chagas disease: what is known and what is needed A background article. Mem. Inst. Oswaldo Cruz *102*, 113-122.
- Coura, J. y Borges-Pereira, J. (2010). Chagas disease: 100 years after its discovery: A systemic review. Acta Tropica *115*, 5-13.
- Coura, J. y Dias, J. (2009). Epidemiology, control and surveillance of Chagas disease-100 after its discovery. Mem. Inst. Oswaldo Cruz *104*, 31-40.
- Coura, J., Junqueira, A., Fernandes, O., Valente, S. y Miles, M. (2002). Emerging Chagas disease in Amazonian Brazil. Trends Parasitol. *18*, 171–176.
- Di Noia, J., Sánchez, D. y Frasch, A. (1995). The protozoan *Trypanosoma cruzi* has a family of genes resembling the mucin genes of mammalian cells. J. Biological Chemistry *270*, 24146–24149.
- Dias, J. y Schofield, C. (1999). The evolution of Chagas Disease (American Trypanosomiasis) Control after 90 years since Carlos Chagas discovery. Mem. Inst. Oswaldo Cruz *94*, 103-121.
- Dias, J., Bastos, C., Araújo, E., Mascarenhas, A., Netto, E., Grassi, F., Silva, M., Tatto, E., Mendonça, J., Araújo, R. *et al.* (2008). Acute Chagas disease outbreak associated with oral transmission. Rev.Soc.Bras. Med.Trop. *41*, 296-300.
- Eickhoff, C., Giddings, O., Yoshida, N. y Hoft, D. (2010). Immune responses to gp82 provide protection against mucosal *Trypanosoma cruzi* infection. Mem. Inst. Oswaldo Cruz *105*, 687-691.
- Franco, F., Paranhos-Bacallà, G., Yamauchi, L., Yoshida, N. y Silveira, J. (1993).

- Characterization of a cDNA Clone Encoding the Carboxy-Terminal Domain of a 90 Kilodalton Surface Antigen of *Trypanosoma cruzi* Metacyclic Trypomastigotes. *Infection and Immunity* 61, 4196-4201.
- Gascon, J., Bern, C. y Pinazo, M.J. (2010). Chagas disease in Spain, the United States and other non-endemic countries. *Acta Tropica* 115, 22-27.
- Gentil, L., Cordero, E., Carmo, M., Machado, M. y Silveira, J. (2009). Posttranscriptional mechanisms involved in the control of expression of the stage-specific GP82 surface glycoprotein in *Trypanosoma cruzi*. *Acta Tropica* 109, 152-158.
- Guhl, F., y Lazdins-Helds, J.K. (2005). Reporte del grupo de trabajo científico sobre la Enfermedad de Chagas. (Ginebra: OMS).
- Livak, K. y Schmittgen, T. (2001). Analysis of Relative Gene Expression Data using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ Method. *Methods* 25, 402-408.
- Málaga, S. y Yoshida, N. (2001). Targeted reduction in expression of *Trypanosoma cruzi* surface glycoprotein gp90 increases parasite infectivity. *Infect Immun* 69, 353-359.
- Manque, P., Eichinger, D., Juliano, M., Juliano, L., Araya, J. y Yoshida, N. (2000). Characterization of the cell adhesion site of *Trypanosoma cruzi* metacyclic stage surface glycoprotein gp82. *Infect Immun* 68, 478-484.
- Miles, M., Toye, P., Oswald, S., y Godfrey, D. (1977). The identification by isoenzyme patterns of two distinct strain groups of *Trypanosoma cruzi* circulating independently in a rural area of Brazil. *Trans. Royal Soc. Trop. Med. Hyg* 71, 217-225.
- Montenegro, V., Jiménez, R., Dias, J. y Zeledón, R. (2002). Chagas Disease in Dogs from

- Endemic Areas of Costa Rica. Mem.Inst. Oswaldo Cruz 97, 491-494.
- Morel, C., Deane, M. y Gonçalves, A. (1980). The complexity of *Trypanosoma cruzi* populations revealed by schizodeme analysis. Parasitology Today 2, 97-101.
- Mortara, R., Silva, S., Araguth, M., Blanco, S. y Yoshida, N. (1992). Polymorphism of the 35- and 50-kilodalton surface glycoconjugates of *Trypanosoma cruzi* metacyclic trypomastigotes. Infect. Immun. 60, 4673-4678.
- Nogueira, N. (1983). Host and parasite factors affecting the invasion of mononuclear phagocytes by *Trypanosoma cruzi*. Ciba Foundation Symposium 99, 52-73.
- OMS. (2003). Control de la Enfermedad de Chagas: Informe del Comité de expertos de la OMS Informe técnico no.917 (OMS Ginebra).
- Ortega-Barria, E. y Pereira, M. (1991). A novel *T. cruzi* heparin binding protein promotes fibroblast adhesion and penetration of engineered bacteria and trypanosomes into mammalian cells. Cell 67, 411-421.
- Pereira, K., Schmidt, F., Guaraldo, A., Franco, R., Dias, V. y Passos, L. (2009). Chagas' Disease as a Foodborne Illness. Journal of Food Protection 72, 441-446.
- Punukollu, G., Gowda, R., Khan, I., Navarro, V. Y Vasavada, B. (2007). Clinical aspects of the Chagas' heart disease. Int. Journal of Cardiology 115, 279-283.
- Ruiz, R., Favoretto, S., Dorta, M., Oshiro, M., Ferreira, A., Manque, P. y Yoshida, N. (1998). Infectivity of *Trypanosoma cruzi* strains is associated with differential expression of surface glycoproteins with differential Ca²⁺ signalling activity. Biochem. J. 330, 505-511.

- Scharfstein, J., Schmitz, V., Morandi, V. *et al.* (2000). Host cell invasion by *Trypanosoma cruzi* is potentiated by activation of bradykinin B2 receptors. *Journal of Experimental Medicine*. *192*, 1289–1299.
- Silva, N., Clausell, D., Nubilos, H., Mello, A., Ossanai, J., Rapone, T., y Snell, T. (1968). Surto epidémico da doença de Chagas com prova vel contaminacao oral. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo* *10*. 265–276.
- Songthamwat, D., Kajihara, K., Kikuchi, M., Uemuram, H., Manh Tran, S., Yanagi, T., Higo, H., y Hirayama, K. (2007). Structure and expression of three gp82 gene subfamilies of *Trypanosoma cruzi*. *Parasitology International* *56*, 273–280.
- Sousa, M.A. (1983). A simple method to purify biologically and antigenically preserved bloodstream trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi* using DEAE-Cellulose columns. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* *78*, 317-333.
- Sousa, M.A. (1999). Morphobiological characterization of *Trypanosoma cruzi* Chagas, 1909 and its distinction from other Trypanosomes. *Mem.Inst. Oswaldo Cruz* *94*, 205-210.
- Souto-Padrón, T., Campetella, O., Cazzulo, J. y Souza, W. (1990). Cysteine proteinase in *Trypanosoma cruzi*: immuno- cytochemical localization and involvement in parasite-host cell interaction. *Journal of Cell Science* *96*, 485–490
- Souto, R., Fernandes, O., Macedo, A., Campbell, D., y Zingales, B. (1996). DNA markers define two major phylogenetic lineages of *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol* *83*, 141-152.
- Souza, W., Carvalho, T. y Santos, E. (2010). Review on *Trypanosoma cruzi*: Host Cell

- Interaction. International Journal of Cell Biology. Doi:10.1155/2010/295394
- Tanuri, A., Andrade, P. y Almeida, D. (1985). *Trypanosoma cruzi*: Isolation of cloned strains and characterization of their infectivity. Journal of Parasitology 71, 397-402.
- Teixeira, M. y Yoshida, N. (1986). Stage-specific surface antigens of metacyclic trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi* identified by monoclonal antibodies. Mol. Biochem. Parasitol. 18, 271-282.
- Tibayrenc, M. y Ayala, J. (1987). *T. cruzi* populations: more clonal than sexual. Parasitology Today 7, 228-292.
- Torres, L., Garcia, Z., Arauz, P. y Taylor, L. (2004). Prevalencia de anticuerpos contra el *Trypanosoma cruzi* en donantes de sangre de la Seguridad Social- Costa Rica. Setiembre 2003 - Setiembre 2004. Rev. Costarric. Cienc. Méd. 25, 15-26.
- Umezawa, E., Stolf, A., Corbett, C., y Shikanai-Yasuda, M. (2001). Chagas' disease. Lancet 357, 797-799.
- Villalta, F., Smith, C., Ruiz-Ruano, A. y Lima, M.F. (2001). A ligand that *Trypanosoma cruzi* uses to bind to mammalian cells to initiate infection. FEBS Lett. 505, 383-388.
- Yoshida, N. (2009). Molecular mechanisms of *Trypanosoma cruzi* infection by oral route. Mem.Inst.Oswaldo Cruz 104, 101-107.
- Zeledón, R. (1996). Hemoflagellates. En Medical Microbiology, S. Baron, 4 ed. (Texas: University of Texas Medical Branch at Galveston), pp. 981-994.
- Zeledón, R., Calvo, N., Montenegro, V., Lorosa, E. y Arévalo, C. (2005). A survey on *Triatoma dimidiata* in an urban area of the province of Heredia, Costa Rica.

Mem.Inst. Oswaldo Cruz *100*, 607-612.

Zeledón, R., Trejos, M., y Chinchilla, M. (1977). Experimental infection of mice with blood, culture and insect forms of *Trypanosoma cruzi* by different routes. *Protozoology* *3*, 95-101.

Zeledón, R., Ugalde, J. y Paniagua, L. (2001). Entomological and Ecological Aspects of six sylvatic species of Triatomines (Hemiptera, Reduviidae) from the collection of the National Biodiversity Institute of Costa Rica. Central America. Mem. Inst. Oswaldo Cruz *96*, 757-764.