



Universidad
de Carabobo

Salus



Facultad de Ciencias de la Salud

Revista de la Facultad de Ciencias de la Salud-Universidad de Carabobo

VOLUMEN 17 - SUPLEMENTO - AÑO 2013

I.S.S.N. 1316-7138 Depósito Legal: PP 97-0182

BIOMOLP. VEINTE AÑOS DE INVESTIGACIÓN PARASITOLÓGICA

EDITORIAL

Veinte años de investigación parasitológica en el Instituto BioMolP y el dilema de la Producción Intelectual versus la Autogestión de recursos.

ARTÍCULOS

Cambios morfológicos, proteicos, glicoproteicos y antigénicos de *Trypanosoma cruzi* cultivado en medio axénico con tensiones de oxígeno diferentes.

Epimastigogénesis de *Trypanosoma cruzi* Dm28c en medio ML15-HA: Análisis proteico, glicoproteico y antigénico.

Factores de riesgo, nivel de conocimiento y seroprevalencia de enfermedad de Chagas.

Mantenimiento y transporte del *Blastocystis sp.* en condiciones de vitalidad.

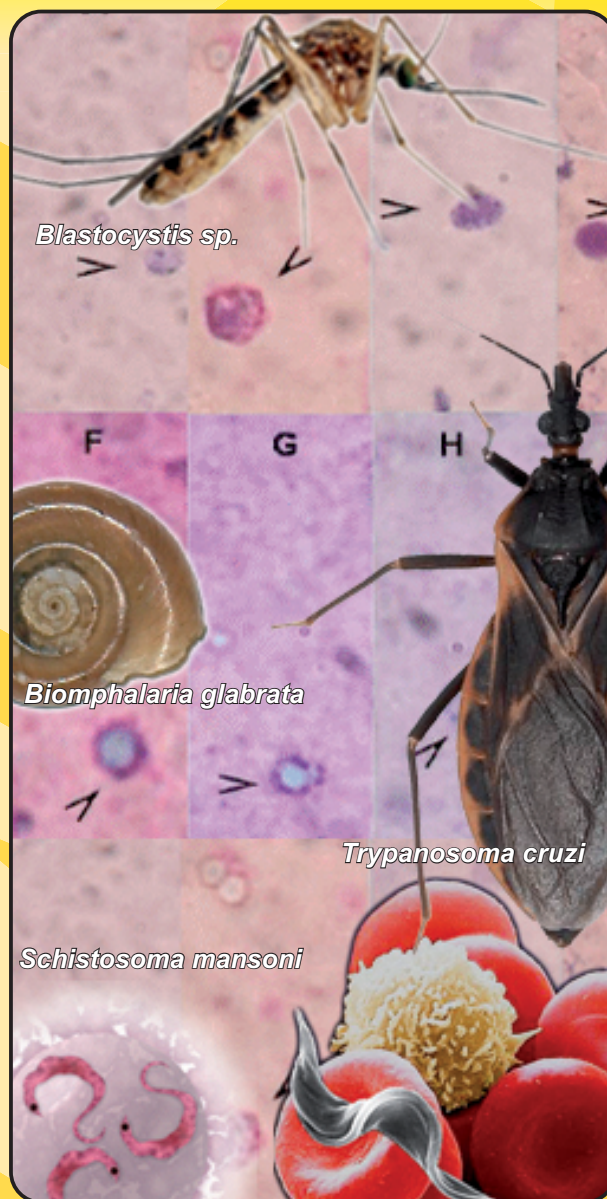
Efecto de los microorganismos acuáticos (rotífera y ciliata) sobre la emisión de cercarias de *Schistosoma mansoni*, por *Biomphalaria glabrata* en el laboratorio.

Efecto del tratamiento con praziquantel sobre la actividad de la fosfatasa alcalina, fosfatasa ácida, superóxido dismutasa en extractos crudos y productos de excreción-secreción de gusanos de *Schistosoma mansoni*.

Relación entre cambios en la expresión de proteasas y metacicloogénesis espontánea asociadas a las condiciones de mantenimiento de *Trypanosoma cruzi* en el laboratorio.

Política general de la revista e instrucciones para los autores.

Norma para los árbitros.



CONSEJO DE DESARROLLO
CIENTÍFICO Y HUMANÍSTICO

ÍNDICE REVENCYT: RV5001

<http://servicio.cid.uc.edu.ve/fcs/>
<http://salus-online.fcs.uc.edu.ve/>

VALENCIA - VENEZUELA



Universidad
de Carabobo

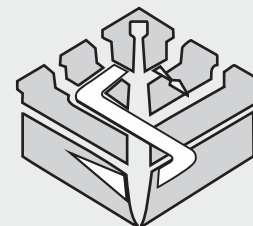
UNIVERSIDAD DE CARABOBO AUTORIDADES RECTORALES

Rectora
Jessy Divo de Romero

Vicerrector Académico
Ulises Rojas

Vicerrector Administrativo
José Ángel Ferreira

Secretario
Pablo Aure



Facultad de Ciencias de la Salud

AUTORIDADES DE LA FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

Decano
José Corado

Comisionada del Decano Sede Aragua
María Lizardo

Asistente al Decano
Daniel Aude

Director Escuela de Medicina Sede Carabobo
Rafael Green

Directora Escuela de Medicina Sede Aragua
María Elena Divo

Directora Escuela de Bioanálisis Sede Carabobo
Haifah Kuder

Directora Escuela de Bioanálisis Sede Aragua
María del Pilar Navarro

Directora Escuela de Enfermería
Ani Nieves

Directora Escuela de Ciencias Biomédicas y Tecnológicas
Lisbeth Loaiza

Directora Escuela de Salud Pública y Desarrollo Social
Enma Martín

Directora de Investigación y Producción Intelectual Sede Carabobo
Ana Rita De Lima

Director de Investigación y Producción Intelectual Sede Aragua
Juan Luis León

Directora de Postgrado Sede Carabobo
Jessica Tweebom

Director de Postgrado Sede Aragua
José Sanchez

Directora BIOMED
Elizabeth Ferrer

Directora INVESNUT
María Concepción Páez

Directora BioMoIP
Emilia Barrios

Directora de Asuntos Estudiantiles Sede Carabobo
Doancely Tovar Bravo

Directora de Asuntos Estudiantiles Sede Aragua
María Victoria Méndez

Directora de Docencia y Desarrollo Curricular Sede Carabobo
Zulma Rodríguez

Directora de Docencia y Desarrollo Curricular Sede Aragua
Yanira Chacín Lanza

Directora de Extensión Sede Carabobo
Everilda Arteaga

Directora de Extensión y Relaciones Interinstitucionales Sede Carabobo
Mercedes Rincones

Directora de Extensión y Relaciones Interinstitucionales Sede Aragua
Rosa Cristina Pérez

Coordinadora de Asuntos Profesorales Sede Carabobo
Milagros Espinosa

Coordinadora de Asuntos Profesorales Sede Aragua
Carolina Méndez

Coordinadora de Administración Sede Carabobo
Gisella Bosco

Coordinadora de Administración Sede Aragua
Luz María Sanoja

Director TIC Sede Carabobo
Salvador Buccella

Director TIC Sede Aragua
Daniel Vivas

Coordinador Docente Biblioteca Ciencias de la Vida Sede Carabobo
Rafael Green

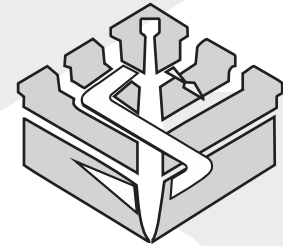
Coordinadora Biblioteca Sede Aragua
Mariela López

Secretaria Consejo de Facultad
Judith Bimanis



Universidad
de Carabobo

Salus



Facultad de Ciencias de la Salud

Institutos y Centros de Investigación de la Facultad de Ciencias de la Salud Universidad de Carabobo.

Instituto de Investigaciones Biomédicas (Biomed.UC)

Dirección: Facultad de Ciencias de la Salud, Núcleo Aragua. 2º Piso.

Teléfonos: (0243) 713685.

Directora: Flor Herrera

E-mail: biomed@telcel.net.ve

Líneas de Investigación:

Estudio del mecanismo de síntesis de proteínas.

Genética de poblaciones de los vectores Malaria y dengue. Bioquímica de ácidos nucleicos; purificación de ARNt a gran escala. Diagnóstico de parasitosis endémicas: Tripanosomiasis, leishmaniasis y oncocercosis. Diseño y optimización de procedimientos para la purificación de enzimas de interés industrial. Estudio de propiedades toxicológicas de productos naturales de interés farmacológico.

Instituto de Investigaciones en Nutrición (INVENUT)

Dirección: Hospital Ángel Larralde, Planta baja, Ala de Consultorios, Bárbula.

Teléfonos: (0241) 8672852 / 8669081

Coordinadora: María Páez

E-mail: ceinut@uc.edu.ve

Líneas de Investigación:

Nutrición de Embarazo. Hambre oculta-Micro Nutrientes. VIT A e Inhibidores de Absorción hierro. Grupos vulnerables/ alteraciones nutricionales.

Centro de Investigaciones Toxicológicas (CITUC)

Dirección: Calle 144 No RIO-211, La Ceiba. Valencia. Venezuela.

Teléfonos: (0241) 8247256 / Telefax: (0241) 8237530

Directora: Doris Nobrega

E-mail: cituc@intercable.net.ve

Página Web:

<http://www.uc.edu.ve/cituc/publico/index.htm>

Líneas de Investigación:

En el área toxicológica y relacionadas, como la salud ocupacional, estudiando los efectos que los agentes tóxicos laborales, ejercen sobre la salud de los trabajadores.

Centro de Estudios en Salud de los Trabajadores (CEST)

Dirección: Instituto de los Altos Estudios de Salud Pública

"Dr. Arnaldo Gabaldon", Av. Bermúdez Sur. Maracay.

Edo. Aragua.

Teléfonos: (0243) 2321001 / Fax: (0243) 2324566

Coordinadora: Aismara Borges Romero

E-mail: Cest@telcel.net.ve

Líneas de Investigación:

Es un centro de investigaciones de la Universidad de Carabobo, dedicado al estudio de los problemas de salud de los trabajadores. Salud Ocupacional, Perfiles en salud, riesgo, condiciones de vida y condiciones de trabajo de trabajadores. Contaminación por plomo,

Análisis integral de puestos de trabajo en condiciones extremas de temperatura, Organización del trabajo y estrés, Efectos de plaguicidas inhibidores de colinesterasa, Prevalencia de anticuerpos serológicos del virus de la Hepatitis B, Capacidad física y factores de riesgo cardiovascular.

Centro de Procesamiento de Imágenes (CPI)

Dirección: Universidad de Carabobo. Facultad de Ingeniería. Av. Universidad. Bárbula. Estado Carabobo. Venezuela. Código Postal 2001.

Teléfonos: (0241) 675251 / Telefax: (0241) 675251

Coordinadora: Hixia Villegas

E-mail: hixia@uc.edu.ve

Páginas Web: <http://cpi.ing.uc.edu.ve>

Líneas de Investigación:

Centro de Investigación de Visualizaciones Científicas, Telemedicina, Usabilidad de Software, Teleeducación y Bioingeniería.

Centro Nacional de Referencia de Flebotomos

Dirección: Facultad de Ciencias de la Salud, Núcleo Aragua. 2º piso.

Teléfonos: (0243) 713685

Coordinadora: Dora Piñero

Líneas de Investigación:

Estadística de Taxonomía, Morfología, Biología y Ecología de Vectores de Enfermedades Metaxénicas. Estudio sobre la Transmisión de la Leishmaniasis en la Zona centro-norte del País y en el Estado Táchira.

Centro de Investigación de Análisis Docente Asistencial del Núcleo Aragua. (CIADANA)

Dirección: Facultad de Ciencias de la Salud, Núcleo Aragua. Edificio, CIADANA

Coordinador: Oliver Castejón

Página Web: www.ciadana.fcs.uc.edu.ve

Líneas de Investigación:

Microscopía de luz y de barrido. Ultraestructura de placenta humana, Estudio de cristales en orina procedentes de mujeres embarazadas. Sangre periférica: estudio morfológico en casos de dengue. Estudio de la membrana basal con técnica de Von Kossa en vesícula molar. Histoquímica ultraestructural de carbohidratos en la placenta humana con el azul alcian.

Centro de Biología Molecular de Parásitos (BioMoIP)

Dirección: Facultad de Ciencias de la Salud, Bárbula, Naguanagua.

Teléfonos: (0241) 8673342

Coordinadora General: Emilia Elena Barrios

E-mail: mnavarro@uc.edu.ve

Líneas de Investigación:

Enfermedades de Chagas Biología Molecular, Morfogénesis, Muta génesis Química, Fraccionamiento, BILHARZIA: Infección en caracoles, Ultra estructura.

Centro de Investigaciones Médicas y Biotecnológicas UC. (CIMBUC)

Dirección: Facultad de Ciencias de la Salud, Bárbula, Naguanagua. Teléfono: (0241) 8666243

Coordinador General: Aldo Reigosa

Página Web: <http://www.cimbuc.fcs.uc.edu.ve>

Líneas de Investigación:

Cáncer de mamas (Imágenes y Marcadores), Cáncer de Piel, Osteoporosis, Metabolismo de Minerales, Calcio y Magnesio, Plantas Medicinales, Androgogía, Microscopía Electrónica, Estudio de Fosfolípidos, Hemolíticos in Vitro en células rojas humanas Control de Calidad de laboratorios, Desarrollos Biotecnológicos para aplicación en Bovinos (Vacunas).

Centro de Investigación de Litiasis Renal y Enfermedades Metabólicas (UNILIME).

Dirección Hospital Ángel Larralde

Teléfonos: (0241) 8677776 / Fax: (0241) 8432959

Coordinador: Pablo Pérez Rodríguez

E-mail: griera@net-uno.net

Líneas de Investigación:

Enfermedades Oseas. Enfermedades Renales. Tratamientos y Estudio de Osteoporosis. Estudio y Tratamiento de la Menopausia

Centro de Investigaciones en Enfermedades Tropicales (CIET-UC)

Dirección: Adyacente al Hospital General de San Carlos Estado Cojedes.

Teléfonos: (0258) 433.7089 / 433.4021

Coordinadora: Lucrecia Contreras

E-mail: lecontreras@uc.edu.ve

Líneas de Investigación:

Leishmaniasis Tegumentaria y Visceral, aspecto clínico-diagnóstico y epidemiológico. Enfermedad de Chagas, aspecto clínico, inmunológico. Epidemiología y control. Parasitosis Intestinales. Clínica-Epidemiológica.

Centro de Investigaciones Ergológicas UC.

Dirección: Área de Estudios de Postgrado-UC, Urb. Trigal Norte, Sector Mañongo, Valencia.

Teléfonos: (0241) 8421215 - 8427665 / Fax: 8430949

Coordinador: Jesús Rodríguez Lastra

Página Web: <http://www.cieruc.fcs.uc.edu.ve>

Líneas de Investigación:

Patologías ocupacionales Respiratorias. Efectos del Trabajo sobre la salud cardiovascular del trabajador. Estudio ergonómico de los puestos de trabajo. Evaluación de las características fisiológicas y Antropométricas del trabajador venezolano. Contaminación por plomo. Estudio del ruido y sus efectos. Tiene la responsabilidad del Postgrado de Salud Ocupacional.

Centro de Investigación en Microbiología Ambiental (CIMA)

Dirección: Bárbula, Valencia.

Coordinador: Luis Medina

E-mail: imedina@uc.edu.ve

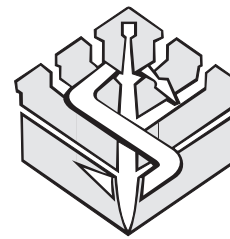
Líneas de Investigación:

Microbiología ambiental, sanitaria y de alimentos. Responsable de la Especialización en Microbiología de aguas.

Dirección: Revista *Salus*, Universidad de Carabobo, Facultad de Ciencias de la Salud, Bárbula, Área de Ciencias Básicas de Medicina Naguanagua, Estado Carabobo, Venezuela.

E-mail: salus@uc.edu.ve

<http://servicio.cid.uc.edu.ve/fcs/> - <http://salus-online.fcs.uc.edu.ve/>

**Presidente del Consejo Superior**

José Corado

Editora

Marisol García de Yegüez

Co-Editor

Germán González

Asesor Técnico

Milagros Espinoza

Miembros

Amarilis Guerra

Harold Guevara

Yalitz Aular

Belén Salinas

Aldo Reigosa

Salus Online

Ricardo Montoreano

Asesores

Mercedes Márquez - Cruz M Aguilar - Wolfan Araque

María Jordán de Pelayo - Gladys Febres de Salas

Ricardo Montoreano - Julio González - Juan Ludert

Guillermo Wittembury - Michael Parkhouse

César Pérez Maldonado - Esmeralda Vizzi

Colaboradores

Jeannette Silva (Dpto. Idiomas UC)

Mayra Rebolledo (Webmaster)

Correctores de Redacción y Estilo

Jeannette Silva

Sioly Mora de Orta

Luis Díaz

Árbitros

Miembros del personal docente y de investigación de la Universidad de Carabobo y otras instituciones de educación superior.

Esta revista ha sido financiada por el Consejo de Desarrollo Científico, Humanístico y Tecnológico de la Universidad de Carabobo.

La revista *Salus* se encuentra indizada en EMBASE y el Índice de Revistas Venezolanas en Ciencia y Tecnología (Revenicyt - Índice RV5001) - Fundacite Mérida, e incluida en el Registro de Publicaciones Científicas y Tecnológicas Venezolanas FONACIT. Registrada en LATINDEX (Catálogo), Sistema Regional de Información en Línea para Revistas Científicas de América Latina, España y Portugal. Registrada en la base de datos PERIODICA, DOAJ y en Scientific Electronic Library Online (Scielo). Miembro de la Asociación de Editores de Revistas Biomédicas Venezolanas-ASEREME.

La periodicidad anual de *Salus* comprende tres números ordinarios y un suplemento especial. Tiraje: 300 ejemplares.

Imagen de Portada:

Collage alegórico sobre imagen de fondo:

Blastocystis sp. formas granulares y vacuolares.

Diseño de Portada:

Victor Herrera

Contenido

EDITORIAL

Veinte años de investigación parasitológica en el Instituto BioMoIP y el dilema de la producción intelectual versus la autogestión de recursos.

Emilia E. Barrios..... 3

ARTÍCULOS

Cambios morfológicos, proteicos, glicoproteicos y antigénicos de *Trypanosoma cruzi* cultivado en medio axénico con tensiones de oxígeno diferentes.

Diana Graterol, Rosa Arteaga, Ángel Castillo, Gabriel Díaz, Oriana Mundaray, Wilmer Pineda, María C Navarro, María Domínguez, Ana Rita De Lima, Víctor T Contreras 4

Epimastigogénesis de *Trypanosoma cruzi* Dm28c en medio ML15-HA: Análisis proteico, glicoproteico y antigénico.

Diana Graterol, Dioglenny Ramírez, Andrea Ramos, Rosa Arteaga, Oriana Mundaray, Wilmer Pineda, María C Navarro, María Domínguez, Ana Rita De Lima, Víctor T Contreras..... 12

Factores de riesgo, nivel de conocimiento y seroprevalencia de enfermedad de Chagas, en el Municipio San Diego, Estado Carabobo, Venezuela.

Oriana Mundaray, Nicolás Palomo, Marvin Querales, Ana Rita De Lima, Víctor Contreras, Diana Graterol, Emilia Barrios..... 19

Mantenimiento y transporte del *Blastocystis sp.* en condiciones de vitalidad.

Emilia Barrios, Stanisfel Castillo, Eurimar Goitia, Olga Ojeda, Wolfan Araque, Víctor Delgado..... 28

Efecto de los microorganismos acuáticos (rotífera y ciliata) sobre la emisión de cercarias de *Schistosoma mansoni*, por *Biomphalaria glabrata* en el laboratorio.

María G Barrios, Emilia E Barrios, María L Marquez, Rowhiny Hernández, Juan Fernando Quintana, Olga Ojeda 35

Efecto del tratamiento con praziquantel sobre la actividad de la fosfatasa alcalina, fosfatasa acida, superóxido dismutasa en extractos crudos y productos de excreción-secreción de gusanos de *Schistosoma mansoni*.

Emilia E Barrios, Jesús Rodríguez, Naim Richani, Wolfan Araque, Juan F Quintana, Lisset Sánchez 40

Relación entre cambios en la expresión de proteasas y metaciclógenesis espontánea asociadas a las condiciones de mantenimiento de *Trypanosoma cruzi* en el laboratorio.

Yhol Ledezma, María Ledezma, Marlyn León, Wilmer Pineda, Rosa Arteaga, María C Navarro, Víctor Contreras, Ana Rita De Lima 47

Política general de la revista e instrucciones para los autores55

Normas para los árbitros63

Dirección:Revista *Salus*, Universidad de Carabobo

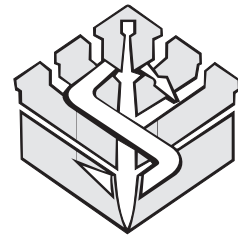
Facultad de Ciencias de la Salud,

Bárbula, Área de Ciencias Básicas

Valencia, Estado Carabobo, Venezuela.

<http://salus-online.fcs.uc.edu.ve/><http://servicio.cid.uc.edu.ve/fcs/>E-mail: salus@uc.edu.ve**Diagramación:**Mayra Rebolledo mrebolle@uc.edu.veVictor Herrera victor29_herrera@hotmail.com

Impreso por:



Superior Council

José Corado

Editor

Marisol García de Yegüez

Co-Editor

Germán González

Technical Advisor

Milagros Espinoza

Members

Amarilis Guerra
Harold Guevara
Yalitza Aular
Belén Salinas
Aldo Reigosa

Salus Online

Ricardo Montoreano

Advisors

Mercedes Márquez - Cruz M Aguilar - Wolfan Araque
María Jordán de Pelayo - Gladys Febres de Salas
Ricardo Montoreano - Julio González - Juan Ludert
Guillermo Witterbury - Michael Parkhouse
César Pérez Maldonado

Collaborators

Jeannette Silva (UC Languages Department)
Mayra Rebolledo (Webmaster)

Style and Writing Editors

Jeannette Silva
Sioly Mora de Mota
Luis Díaz

Reviewers

Faculty and research member of the Carabobo
University.

This magazine has been funded by the Council of
Scientific Humanistic and Technological Development
(CDCH) at the University of Carabobo.

Salus is registered by: EMBASE, "Revistas Venezolanas
en Ciencia y Tecnología" (Revenicyt- Índice RV5001) -
Fundacite Mérida, "Registro de Publicaciones Científicas
y Tecnológicas Venezolanas" (FONACIT). LATINDEX,
(Catalog), in the "Sistema Regional de Información
en Línea para Revistas Científicas de América Latina,
España y Portugal". The PERIODICA data base and
Scientific Electronic Library Online (SciELO). Member
of Asociación de Editores de Revistas Biomédicas
Venezolanas - ASEREME.

The anual periodicity of *Salus* is three ordinary
numbers and one special supplement.

Prints: 300 copies.

Cover image:

Alegore collage. Background: *Blastocystis sp.*

Cover design:

Victor Herrera

Table of contents

EDITORIAL

**Twenty years of parasitology research at the BioMoIP
Institute, and the dilemma of intellectual output versus
resource self-managemet.**

Emilia E. Barrios..... 3

ARTICLES

**Morphological, protein, glycoprotein and antigenic changes
of *Trypanosoma cruzi* cultured in axenic medium with
different oxygen tensions.**

Diana Graterol, Rosa Y Arteaga, Ángel Castillo, Gabriel Díaz, Oriana
Mundaray, Wilmer Pineda, María C Navarro, María Domínguez, Ana
Rita De Lima, Víctor T Contreras 4

***Trypanosoma cruzi* Dm28c Epimastigogenesis in ML15-HA
medium: protein, glycoprotein and antigen analyses.**

Diana Graterol, Dioglenny Ramírez, Andrea Ramos, Rosa Arteaga,
Oriana Mundaray, Wilmer Pineda, María C Navarro, María Domínguez,
Ana Rita De Lima, Víctor T Contreras..... 12

**Risk factors, level of knowledge and seroprevalence of
Chagas disease, in San Diego County, Carabobo State,
Venezuela.**

Oriana Mundaray, Nicolás Palomo, Marvin Querales, Ana Rita De Lima,
Víctor Contreras, Diana Graterol, Emilia Barrios..... 19

**Maintenance and transport *Blastocystis sp* in conditions
of vitality.**

Emilia Barrios, Stanislaf Castillo, Eurimar Goitia, Olga Ojeda, Wolfan
Araque, Víctor Delgado 28

**Effect of aquatic organisms (rotifers and ciliate) on the
issuance of *Schistosoma mansoni* larvae by *Biomphalaria
glabrata* maintained in laboratory.**

María G Barrios, Emilia E Barrios, María L Marquez, Rowhiny Hernández,
Juan Fernando Quintana, Olga Ojeda 35

**Effect of treatment with Praziquantel on the activity of
alkaline phosphatase acid phosphatase, superoxide
dismutase in crude extracts and excretion-secretion
products of *Schistosoma mansoni* worms.**

Emilia E Barrios, Jesús Rodríguez, Naim Richani, Wolfan Araque, Juan
F Quintana, Lisset Sánchez 40

**Relationship between changes in the expression of
proteases and spontaneous metacyclogenesis associated
to *Trypanosoma cruzi* maintenance conditions in the
laboratory.**

Yhol Ledezma, María Ledezma, Marlyn León, Wilmer Pineda, Rosa
Arteaga, María C Navarro, Víctor Contreras, Ana Rita De Lima 47

General policies and instructions to authors 59

Guidelines for reviewers 64

Address:

Revista *Salus*, Universidad de Carabobo
Facultad de Ciencias de la Salud,
Bárbula, Área de Ciencias Básicas
Valencia, Estado Carabobo, Venezuela.

<http://salus-online.fcs.uc.edu.ve/> <http://servicio.cid.uc.edu.ve/fcs/>
E-mail: salus@uc.edu.ve

Design:

Mayra Rebolledo mrebolle@uc.edu.ve
Victor Herrera victor29_herrera@hotmail.com
Printed by

Nota del Comité Editorial

La revista Salus publica tres ejemplares al año y un suplemento.

Para los números regulares, los artículos son recibidos por el Comité Editorial, enviados a los árbitros y evaluados debidamente para su publicación. El procedimiento para los suplementos es algo distinto, ya que es el Comité Editorial quien elige el tema e invita a un Editor Responsable, que a su vez, invitará a diversos autores relacionados con su área a participar en el suplemento, aportando sus trabajos originales, los cuales deberá revisar y controlar para que dichos manuscritos se ajusten a la Política General de la revista, a las Instrucciones para los Autores y que la bibliografía cumpla con las indicaciones Vancouver. En este suplemento la Editora Responsable seleccionada fue la profesora Emilia E. Barrios y el tema fue: Veinte años de investigación parasitológica en el Instituto BioMolP.

Veinte años de investigación parasitológica en el Instituto BioMolP y el dilema de la producción intelectual versus la autogestión de recursos

El Instituto de Biología Molecular de Parásitos fue concebido como Centro BioMolP el 07 de Abril del año 1992, con la finalidad de cumplir con funciones de investigación básica en modelos de enfermedades parasitarias de importancia regional y nacional, a fin de facilitar el desarrollo de programas de Investigación aplicada, formación de recurso humano (Técnico y Profesional) y prestación de servicio a la comunidad a través de estudios epidemiológicos, diagnósticos y sociales de las enfermedades parasitarias. Desde sus inicios, el Instituto, ha articulado en perfecta sincronía con las funciones que definen a las Universidades como son, la docencia y la investigación. Ambivalencia de roles cada día más vigentes, debido a lo complejidad y heterogeneidad de la enseñanza universitaria, que incluye estudios de cuarto, quinto nivel y la supervisión en campos cada vez más especializados.

Asimismo, porque la función de investigación se ha convertido en el papel fundamental para las Universidades que encabezan los ranking mundiales de excelencia y, donde las compensaciones académicas y el prestigio internacional son otorgados función de la productividad individual en investigación pura o básica orientada a la búsqueda de nuevos conocimientos, mediante premiaciones como los premios Nóbel. Por otro lado, la investigación aplicada que deriva de la investigación básica, es empleada en la solución de problemas específicos, elaboración de productos y desarrollo de tecnologías, ocupa un segundo lugar, pero no siempre genera las compensaciones académicas de estímulo al sector. Actualmente, se impone a las Universidades el cumplimiento de múltiples funciones, que afecta los indicadores de calidad académica e investigación. Ello plantea nuevas inquietudes en el sentido de más funciones por desempeñar con menos recursos disponibles, especialmente porque en la mayoría de los campos científicos se requiere financiamientos de infraestructura con equipamientos sofisticados, contrastando con otros que sólo requieren recursos bibliotecarios, herramientas informáticas y comunicación, quedando en franca desventaja los primeros. En respuesta, existen países que han desarrollado

iniciativas como los modelos de investigación temáticas de integración vertical en el área biomédica (Font et al. 2008), para abordar aspectos clínicos, epidemiológicos, socio-sanitarios, biología celular, genética y molecular del objeto de investigación, integrando a los programas Institutos de Investigación básica y aplicada de universidades y centros clínicos, con el soporte de fundaciones biomédicas hospitalarias que administran los recursos independientes de los centros de atención clínica, captando recurso humano mediante la contratación de investigadores para el desarrollo de proyectos de investigación, al margen de la administración hospitalaria per se. Actualmente, el escenario deseable es la Universidad docente, investigativa, productiva y crítica (Corona, 2013), donde la función docente esté sustentada por la actividad de investigación y el ejercicio profesional. Roles en los cuales la existencia de los Institutos de investigación, como entes generadores de recurso humano formado en pre y post-grado y de producción intelectual, no sólo acreditada, si no con aplicación en la resolución de problemas en las comunidades, constituyen garantía del cumplimiento cabal de la razón de ser de la Universidad. Dejando la productividad supeditada a actividades no directamente vinculadas a la Universidad, específicamente en áreas tecnológicas que por su naturaleza puedan ser incorporadas a la solución de problemas en la población, bajo el control de criterios críticos que contribuyan a generar opiniones en la sociedad.

Emilia E. Barrios
*Instituto de Biología Molecular de Parásitos
 (Instituto BioMolP), FCS-UC
 E-mail: barrios.emilia@gmail.com*

Cambios morfológicos, proteicos, glicoproteicos y antigénicos de *Trypanosoma cruzi* cultivado en medio axénico con tensiones de oxígeno diferentes.

Diana Graterol¹, Rosa Yanet Arteaga¹, Ángel Castillo², Gabriel Díaz², Oriana Mundaray¹, Wilmer Pineda¹, María Consuelo Navarro¹, María Isabel Domínguez¹, Ana Rita De Lima¹, Víctor Tulio Contreras¹

RESUMEN

Se ha reportado cultivo axénico de amastigotas de *Trypanosoma cruzi* derivados de epimastigotas. Se cuestiona si formas redondas en cultivos axénicos son verdaderos amastigotas. Aquí se compararon los cambios biológicos y moleculares de epimastigotas creciendo en alta y baja tensión de oxígeno. *T. cruzi* (EPM6) se creció en frascos con diferentes alturas de medio LITB (condición horizontal 3 mm y vertical 83 mm). Se colectaron masas de parásitos de diferentes tiempos de crecimiento para análisis proteico, glicoproteico y antigénico. Se estudiaron los cambios morfológicos, incremento de inóculo y resistencia al complemento por microscopía de fases y tinción con Giemsa. Los cambios proteicos y glicoproteicos se compararon por SDS-PAGE. Los cambios antigénicos se analizaron por Western blot con suero de conejo y anticuerpos IgY contra formas amastigotas. En condición vertical, los epimastigotas mantuvieron su morfología típica a lo largo de la curva de crecimiento y no mostraron cambios moleculares significativos. En condición horizontal al 4to y 6to día predominaron formas redondas con capacidad de resistir la lisis por complemento. A partir del 4to día se observaron cambios en los perfiles proteicos y glicoproteicos, concomitantemente con los cambios morfológicos. El suero anti-amastigotas reveló un antígeno amastigota-específico transitorio de 55 kDa en parásitos de 4 días en la condición horizontal, mientras el anticuerpo IgY anti-amastigotas no reveló diferencias entre parásitos creciendo en ambas condiciones. Estas evidencias sugieren que epimastigotas de *T. cruzi* condicionados a sobrevivir en alta tensión de oxígeno puede mimetizar propiedades biológicas y antigénicas propias del estadio amastigota.

Palabras Clave: *Trypanosoma cruzi*, tensión de oxígeno, formas redondas, cultivo axénico.

ABSTRACT

Morphological, protein, glycoprotein and antigenic changes of *Trypanosoma cruzi* cultured in axenic medium with different oxygen tensions

Axenic culture of epimastigote-derived amastigotes of *Trypanosoma cruzi* has been reported. Have been inquired why round forms appear in culture media and if are true amastigotes. Our proposal was study molecular and biological changes in epimastigotes growing in high and low oxygen tension. *T. cruzi* (EPM6) were grown in flasks with different height of LITB medium (horizontal condition 3 mm and vertical 83 mm). Parasites were collected masses of different times of growth for proteins, glycoproteins and antigenic analysis. Morphological changes, increase of inoculum and resistance to complement lyses were studied in phase's microscopy and Giemsa-stained smears. Protein and glycoprotein changes were compared by SDS-PAGE. Antigenic changes were analyzed by Western blot with rabbit serum and IgY antibody against amastigote forms. In vertical condition, the epimastigote maintained its typical morphology along the growth curve and not showed significant molecular changes. In horizontal condition round forms prevailed at 4 and 6 days with capacity to resist lyses by complement. From the 4th day changes in proteins and glycoproteins profiles were observed, concomitantly with the morphological changes. Anti-amastigotes serum revealed a 55 kDa transitory amastigote-specific antigen in four day parasites' from horizontal condition, while IgY antibody anti-amastigotes don't revealed differences between parasites grown in both conditions. These evidences suggest that epimastigotes of *T. cruzi* conditioned to survive in high oxygen tension can mimic biological and antigenic properties own the amastigote-stage.

Key Words: *Trypanosoma cruzi*, oxygen tension, round forms, axenic culture.

INTRODUCCIÓN

En su ciclo vital, *T. cruzi*, agente causal de la enfermedad de Chagas, transita por distintos microambientes y en cada uno de ellos presenta estadios con morfologías diferentes. Se presume que factores microambientales específicos afectan estas morfologías. El cultivo axénico de *T. cruzi*, permite mantener el parásito en el laboratorio sin usar un modelo animal y sin la laboriosidad que demanda el cultivo de tejido y células in vitro. *T. cruzi* cultivado en tubos o erlenmeyer, en reposo y a temperatura ambiente (27°C) crece según una curva sigmoidea con tres fases: latencia, exponencial y estacionaria (1); siendo la morfología predominante epimastigota. La forma de la curva y los parásitos varía si crecen en agitación y con inóculos altos, porque rápidamente agotan el medio y entran en fase estacionaria (2).

¹ Laboratorio de Protozoología. Instituto de Biología Molecular de Parásitos (BioMolP). Facultad de Ciencias de la Salud. Universidad de Carabobo. Venezuela.

² Facultad Experimental de Ciencias y Tecnología (FACYT). Universidad de Carabobo. Venezuela

Correspondencia: Víctor T. Contreras.

E-mail: convictu@cantv.net

Las formas redondas (esferomastigotas) que aparecen al inicio de la fase logarítmica y en la fase estacionaria tardía de *T. cruzi* en medios axénicos, no son iguales. Tyler y Engman (3) propusieron que las formas redondeadas al inicio son formas epimastigotas redondeadas con flagelo corto, producto de la presencia de glucosa en el medio y su depleción conduce a epimastigotas típicos. Las formas redondeadas presentes en la fase estacionaria son formas en degeneración producto de la toxicidad del medio. Se ha sugerido que la hipertonía del microambiente en tripanosomas africanos afecta la morfología del parásito (4). Ellenbogen et al (5) observaron que al aumentar la temperatura, en cultivos sucesivos de *Crithidia fasciculata*, se incrementaba el porcentaje de formas redondeadas. Efecto que era prevenido aumentando la osmolaridad con NaCl en los medios de cultivo, cuando la temperatura se incrementaba hasta 32°C. Andrade y Almeida (6) cultivaron *Herpetomonas samuelpessoai* en tubos de ensayo (15 x 150 mm), variando la tensión de oxígeno disuelto (TOD) en función de la altura de la columna de medio (60, 160 y 260 mm) con volúmenes diferentes. Observaron que una caída en la TOD y consecuentemente del pH, provocaba la ocurrencia de formas de transición. Ellos destacaron la importancia de la TOD en la morfogénesis de este tripanosomatideo.

Para garantizar la reproducibilidad de fenómenos de diferenciación como metaciclogénesis, amastigogénesis y epimastigogénesis de *T. cruzi* en medios axénicos es necesario trabajar con poca altura de medio para ofrecer adecuada TOD (7). Graterol et al (8) reportaron que durante la epimastigogénesis de *T. cruzi*, la duración de la morfología amastigotas en su transición desde tripomastigota sanguíneo a epimastigota se reduce cuando se incrementa la altura del medio por exponer los parásitos a una condición de hipoxia. Se ha reportado la obtención de amastigotas de *T. cruzi* y su mantenimiento en cultivos, a partir de formas epimastigotas adaptadas a microambientes particulares en temperatura, nutrientes y tensión de oxígeno (9,10).

Aun en estudios de morfogénesis de tripanosomatideos, se cuestiona cuándo se está frente a un amastigotas genuino, en contraste a flagelados redondeados. Por lo que se ha recurrido a incluir en la valoración criterios morfológicos finos, expresión génica, propiedades biológicas, y características metabólicas y antigénicas (11). Estos criterios han sido complementados proponiendo como fundamental que el estadio en cuestión cumpla con la secuencia natural de eventos que ocurren en el ciclo natural del parásito (7).

En este trabajo, se compara el crecimiento de *T. cruzi* en dos condiciones ambientales diferentes, analizando los cambios biológicos y moleculares para evidenciar si un estadio acondicionado en un microambiente puede mimetizar propiedades biológicas y antigénicas genuinas de otro estadio.

MATERIALES Y MÉTODOS

Parásitos y estadios. Se trabajó con *Trypanosoma cruzi* MHOM/Ve/1967/EPm6 EPm6, tipificado genéticamente como perteneciente al linaje filogenético TcI. El parásito fue clonado y mantenido por pases sucesivos alternos triatomino/ratón (12). Los estadios epimastigota y amastigota extracelular secundario (AES) usado como control se obtuvieron en medio LITB (2) y medio MEMTAU (13), respectivamente. Para el análisis morfológico, resistencia al complemento y análisis molecular, se emplearon parásitos de diferentes días (0 a 12 días) de la curva de crecimiento de las condiciones vertical y horizontal, respectivamente. Para el análisis molecular, los parásitos se procesaron como descrito previamente (8).

Crecimiento de parásitos en la condición vertical y horizontal. Se siguió el protocolo utilizado para epimastigogénesis por Graterol y cols. (8). Las curvas de crecimiento de los flagelados se hicieron por triplicado incubando los parásitos en 35 mL de medio LITB a 27°C por tiempos variables entre 0 y 12 días. La condición vertical correspondiente a bajo tenor de oxígeno, se realizó en tubos cónicos de polipropileno (50 mL) para una altura de 83 mm, y la condición horizontal correspondiente a alto tenor de oxígeno, en frascos de cultivo de poliestireno (T-160 cm²) para una altura de 3 mm. Los inóculos de flagelados empleados en cada condición oscilaron entre 2 y 3 x 10⁶ parásito/mL. Se hizo recuento diferencial bajo microscopía de contraste de fases para estimar (a) incremento del inóculo (Nt/N0); (b) porcentaje de epimastigotas; (c) porcentaje de formas redondas y formas en diferenciación; (d) porcentaje de metacíclicos y (e) porcentaje de formas inmóviles. La morfología de los parásitos se estudió en láminas teñidas con Giemsa-ácido (14), con un aumento final de 1000X en microscopio óptico (Nikon, Eclipse 400) contando al menos 300 formas para determinar porcentajes morfológicos. Las morfologías más representativas se fotografiaron con cámara digital (Nikon, Coolpix, 4500).

Resistencia a la lisis por complemento y obtención de extractos proteicos totales. Parásitos de diferentes tiempos de cultivo en la condición vertical y horizontal fueron sometidos a la acción del complemento y posterior lisis de las masas húmedas obtenidas para extracción de proteínas siguiendo protocolos ya previamente descritos (8).

Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) y comparación antigénica por Western Blot. El fraccionamiento de los extractos proteicos mediante electroforesis en SDS-PAGE, seguida de electro-transferencia a membranas de nitrocelulosa, y el desarrollo del Western Blot se realizó siguiendo los protocolos habituales (15,16). Los cambios proteicos y glicoproteicos se compararon mediante geles teñidos con Coomassie-Plata para proteínas ó Acido periódico-Alcian Blue-Glutaraldehído-Plata (APABGP) para glicoproteínas según Barrios et al (17). Para el análisis de los cambios

antigénicos, se colocaron por canal 4 μg de proteínas de parásitos de tiempos variables entre 0 y 12 días obtenidos de las curvas de crecimiento de la condición vertical y horizontal, proteínas de epimastigotas de 6 días (control) y de amastigotas extracelulares primarios (control).

Los antígenos se revelaron usando anticuerpos primarios producidos contra amastigotas extracelulares secundarios: a) suero preparado en conejo (suero anti-AES; 1/3.000) y b) IgY preparado en gallina (IgY anti-AES; 1/1.000) (8).

Como anticuerpos secundarios se usó anti-IgG de conejo producida en cabra (1/10.000) y anti-IgY de gallina preparado en conejo (1/10.000), ambos conjugados a peroxidasa. Los inmunocomplejos se revelaron mediante quimioluminiscencia, empleando luminol como sustrato (Super Signal, Pierce) y los luminogramas a partir de películas de Rayos X (Medical Film Konica Minolta).

Digitalización, registro fotográfico y análisis. Los luminogramas se digitalizaron en densitómetro (Bio-Rad, Imaging Densitometer, Modelo GS-690) y analizaron con el Software (Bio-Rad Molecular Analyst®/PC 1,2 Software package). Las figuras y fotografías se procesaron por Microsoft Power Point 2007.

RESULTADOS

La tabla 1 muestra los cambios morfológicos y poblacionales que ocurrieron durante el crecimiento de *T. cruzi* EPM6 en medio LITB a 27°C en condición vertical y horizontal. En condición vertical, se aprecia que el porcentaje de epimastigotas se mantiene en torno al 95,8% en los primeros 6 días de cultivo, luego decrece entre el día 6 y 12 (96,0 a 76,6%), mientras que las formas metacíclicas se incrementan de 4,4% (día 6) a 16,6% (día 12).

En esta condición de baja TOD, no se observaron formas redondeadas y la epimastigota fue la morfología predominante a lo largo de la curva de crecimiento. En condición horizontal, al 4° día se aprecia un fuerte incremento de 16,4 veces el inóculo, luego, un incremento abrupto a 97,6 veces al 8° día y una acentuada caída de hasta 64,6 veces el inóculo al 12° día.

Se aprecia que en la condición de alta TOD, varía la morfología predominante, a lo largo de la curva de crecimiento. Al inicio predominan los epimastigotas (94,9%, día 0), seguidamente las formas redondas (68,7%, día 4), al 8° día se incrementa significativamente los metacíclicos (40%) y al 12° día se distribuyen equitativamente las tres morfologías (29,5% epimastigotas, 30,2% formas redondeadas y 31,8% metacíclicos).

Tabla 1. Cambios morfológicos y poblacionales que ocurren durante el cultivo de epimastigotas de *Trypanosoma cruzi* EPM6 en medio LITB a 27 °C (Condición vertical y horizontal)

Tiempo (días)	Porcentaje de formas				N_t / N_0
Vertical					
	E	RD	M	In	
0	94,8	0	5,2	0	1,0
4	95,8	0	4,2	0	7,2
6	96,0	0	4,4	0	9,0
8	85,1	0	11,6	3,3	12,2
12	76,6	3,2	16,6	3,7	13,2
Horizontal					
0	94,9	0,0	5,2	0	1,0
4	30,0	68,7	1,2	0	16,4
6	48,0	48,0	4,0	0	37,6
8	44,1	12,3	40,0	3,6	97,6
12	29,5	30,2	31,8	8,5	64,6

Inóculo = $2,4 \times 10^6$ parásitos/mL; N_t / N_0 = cociente entre el número de parásitos total a tiempo t (N_t) y el número de parásitos a tiempo cero (N_0). E= Epimastigotas; RD= Redondas mas en diferenciación; M= Metacíclicos; In= Inmóviles.

La comparación de las cinéticas de crecimiento de epimastigotas de *T. cruzi* crecidos en igualdad de inóculo, volumen, medio de cultivo y temperatura, variando solo la tensión de oxígeno mostró al cabo de 12 días un incremento del inóculo (N_t / N_0) de 64,6 veces en alta TOD respecto a 13,2 veces en la condición de bajo TOD.

La relación del incremento del inóculo de la condición horizontal sobre la vertical entre los 0 y 8 días muestra una progresión geométrica (día 4, $16,4/7,2 = 2,3$ veces; día 6, $37,6/9,0 = 4,1$ veces; día 8, $97,6/12,2 = 8,0$ veces).

Estos cambios morfológicos se siguieron por microscopía óptica y coloración de Giemsa observándose en la figura 1 que los parásitos crecidos en baja TOD (vertical) muestran la forma epimastigota típica en los diferentes días de la curva de crecimiento (Fotos 0d a 12d, vertical), similarmente a lo observado el día 0 de condición horizontal (Foto 0d, horizontal). Al 4° y 6° día de incubación en la condición de alta TOD (horizontal) se observaron formas redondas que recuerdan la morfología de los amastigotas y formas en diferenciación caracterizados por el acortamiento del cuerpo del epimastigota (Fotos 4d y 6d, horizontal). Los días 8 y 12 se aprecian formas redondas, algunas con flagelo y formas metacíclicos (Fotos 8d y 12d, horizontal).

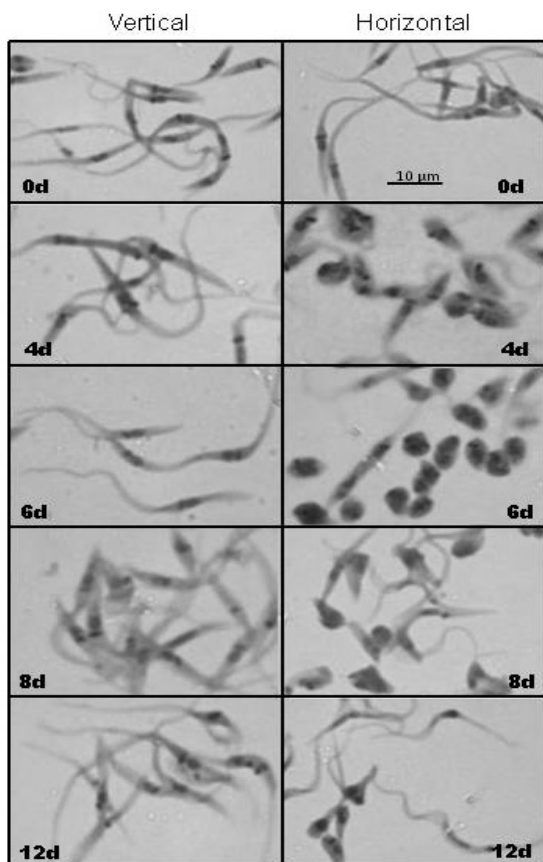


Figura 1. Cambios morfológicos que ocurren durante el crecimiento de epimastigotas de *Trypanosoma cruzi* (EPm6) en medio LITB a 27°C en condición vertical y horizontal. Los números corresponden a tiempo en días. Coloración de Giemsa-ácida (1000 X).

La tabla 2 muestra el porcentaje de resistencia al complemento de las morfologías que aparecen durante el crecimiento de epimastigotas en condición vertical y horizontal. En condición vertical el día 3, no se observaron formas resistentes al complemento (0%) y desde el día 6 al día 12 el porcentaje de formas resistentes fue menor a 1% (vertical, columna Res). Ese 1% de la población total de formas resistentes correspondieron a formas metacíclicas que se incrementaron en el cultivo desde 1,9% el día 6 a 10,4% el día 12 (vertical, columna -C, M) y que fueron 100% resistentes al complemento (vertical, columna +C, M).

Cuando los parásitos crecieron en condición horizontal se observó un incremento progresivo en el porcentaje de formas resistentes desde 14,2% el día 3 hasta 38,7% el día 12 (horizontal, columna Res). Esos porcentajes de formas resistentes estuvieron constituidos predominantemente por formas redondas y metacíclicos. Las formas redondas incrementaron desde un 7,5% el día 3, alcanzaron un pico de 52,5% el día 6 y decrecieron a 31,8% el día 12 (horizontal, columna -C, R) y fueron formas cuya resistencia disminuyó desde 97,3% el día 3 a 25,4% el día 12 (horizontal, columna +C, R). Las formas metacíclicas incrementaron desde un 0,8% el día 3 hasta un 37,1% el día 12 (horizontal, columna -C, M) y presentaron una resistencia variable al complemento un 2,7% el día 3, un 1,3% el día 6, un 23,6% el día 8 y un 71,5% el día 12 (horizontal, columna +C, M).

Tabla 2. Resistencia al complemento de las morfologías que aparecen durante el crecimiento de epimastigotas de *Trypanosoma cruzi* EPm6 en medio LITB a 27 °C (Condición vertical y horizontal)

Condición	Tiempo (días)	Res (%)	Porcentaje de formas					
			R		E		M	
			-C	+C	-C	+C	-C	+C
Vertical	3	0	0	0	100	0	0	0
	6	< 1	0	0	98,1	0	1,9	100
	8	< 1	0	0	92,2	0	7,8	100
	12	< 1	0	0	89,6	0	10,4	100
Horizontal	3	14,2	7,5	97,3	91,7	0	0,8	2,7
	6	50,0	52,5	96,9	46,7	1,9	0,8	1,3
	8	31,8	50,9	76,4	41,1	0	6,3	23,6
	12	38,7	31,8	25,4	31,1	3,1	37,1	71,5

Cantidades iguales de parásitos crecidos en medio LIT a 27°C a los tiempos indicados (días) se incubaron por separado con suero fresco de cobayo inactivado (menos complemento = -C) y no inactivado (mas complemento = +C) durante 30 minutos a 35°C. Res (%)= porcentaje de resistencia corresponde al total de formas que no se lisaron; R= Formas en diferenciación, epis cortos o redondeados; E= Epimastigotas; M= Metacíclicos. Los valores corresponden a experimentos por triplicado.

La figura 2 muestra el análisis de los perfiles proteicos durante el crecimiento en la condición vertical (A) y horizontal (B). El análisis muestra al día 0 para ambas condiciones, un perfil común caracterizado por al menos 18 bandas proteicas de diferente espesor e intensidad (130, 120, 90, 85, 80, 70, 65, 63, 52, 50, 47, 45, 40, 35, 32, 29, 27 y 25 kDa, trazos a la izquierda de los canales 0, Figuras 2A y 2B). Este perfil se conserva hasta el día 12 en la condición vertical y se observan pequeños cambios representados por engrosamiento de dos bandas proteicas al día 4 (65 y 27 kDa, puntas de flecha canal 4, Figura 2A), dos bandas el día 8 (70 y 45 kDa, puntas de flecha canal 8, Figura 2A) y la aparición de una banda de 34 kDa en ese mismo día (trazo corto canal 8, Figura 2A). En la condición horizontal (Figura 2B) se observan cambios mayores, representados por la aparición el día 4 de al menos cinco bandas (95, 72, 55, 38 y 34 kDa, trazos cortos canal 4, Figura 2B) e intensificación de la banda de 35 kDa (punta de flecha canal 4, Figura 2B), los cuales se mantienen hasta el día 12 donde se observa la aparición de una banda de 51 kDa (trazo corto canal 12, Figura 2B).

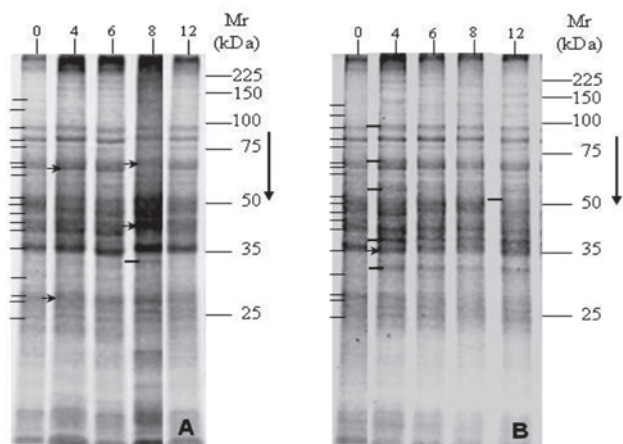


Figura 2. SDS-PAGE al 10% de las proteínas de *Trypanosoma cruzi* (EPm6) durante el crecimiento en medio LITB a 27°C en condición vertical (A) y horizontal (B). Cada canal tiene 8 µg de proteína. Los números 0, 4, 6, 8 y 12 días corresponde al tiempo de incubación en medio LITB. Los números al lado derecho corresponden a la movilidad relativa (Mr) de los marcadores de peso molecular en kDa.

La figura 3 muestra el análisis de los perfiles glicoproteicos durante el crecimiento en la condición vertical (A) y horizontal (B). El análisis muestra al día 0 para ambas condiciones, un perfil común caracterizado por al menos 13 bandas glicoproteicas de diferente espesor e intensidad (145, 130, 95, 82, 60, 50, 46, 40, 30, 29, 27, 25 y 21 kDa, trazos a la izquierda de los canales 0, Figuras 3A y 3B). En la condición vertical a partir del día 4 se intensifican seis bandas glicoproteicas (60, 30, 29, 27, 25 y 21 kDa, triángulos claros canal 4, Figura 3A) y aparece una glicoproteína bien definida (80, punta de flecha canal 4, Figura 3A). En la condición horizontal los cambios más acentuados ocurrieron al 4º día con la aparición de siete bien definidas glicoproteínas (75,

70, 65, 38, 36, 34 y 33 kDa, puntas de flecha canal 4, Figura 3B) que se mantuvieron posteriormente y aparición el día 12 de una glicoproteína de 90 kDa (punta de flecha canal 12, Figura 3B).

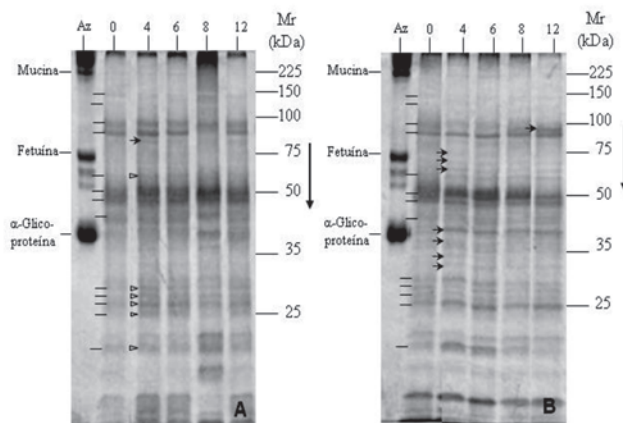


Figura 3. SDS-PAGE al 10% de las glicoproteínas de *Trypanosoma cruzi* (EPm6) durante el crecimiento en medio LITB a 27°C en condición vertical (A) y horizontal (B). Cada canal tiene 12 µg de proteína. Los números 0, 4, 6, 8 y 12 días corresponde al tiempo de incubación en medio LITB. Az= 1,5 µg de mezcla de glicoconjugados, como control de tinción y su posición se muestra al lado izquierdo de la figura. Los números al lado derecho corresponden a la movilidad relativa (Mr) de los marcadores de peso molecular en kDa.

La figura 4 compara los cambios antigénicos que ocurren durante el crecimiento de *T. cruzi* en la condición vertical (A y C) y horizontal (B y D), revelados con anticuerpos que reconocen antígenos comunes y específicos de amastigotas. El suero anti-AES preparado en conejo reveló en la condición vertical tres perfiles antigénicos bien definidos (Figura 4A), uno para los epimastigotas caracterizado por al menos tres bandas antigénicas bien definidas e intensas (70, 60 y 50 kDa, trazos a la izquierda del canal E, Figura 4A), otro para los amastigotas control que muestra un grupo de antígenos no resueltos entre los marcadores de 100 y 50 kDa, donde sobresalen al menos tres bandas antigénicas muy intensas (85, dupla 75/65 y 55 kDa, puntas de flecha blancas a la izquierda del canal A, Figura 4A) y un tercer perfil caracterizado por tres bandas antigénicas intensas (dupleta 75/65, 60 y 50 kDa, puntas de flecha canal 0, Figura 4A) que se mantiene entre los días 0 y 12 de la curva de crecimiento (canales 0, 4, 6, 8 y 12, Figura 4A).

Los cuatro antígenos que identifica el suero anti-AES en parásitos de 0 a 12 días (dupleta 75/65, 60 y 50 kDa) son una combinación de los antígenos controles identificados en los epimastigotas (70, 60 y 50 kDa, canal E) y amastigotas (dupleta 75/65, canal A). En la condición horizontal, el suero anti-AES reveló un perfil antigénico (dupleta 75/65, 60 y 50 kDa, puntas de flecha a la izquierda del canal 0, Figura 4B) muy similar al identificado en la condición vertical. La diferencia antigénica más relevante entre ambas condiciones fue la presencia de un antígeno de 55 kDa en los parásitos de 4 días de la condición horizontal (punta de flecha a la

izquierda del canal 4, Figura 4B) coincidente con el antígeno de 55 kDa revelado en los amastigotas controles (canales A, Figura 4A y 4B). Vale destacar que el día 4 de la curva de crecimiento en la condición horizontal, predominaron las formas redondas (68,7%, columna RD; horizontal Tabla 1). La IgY anti-AES preparada en gallina reveló en la condición vertical tres perfiles antigénicos bien definidos (Figura 4C), uno para los epimastigotas caracterizado por tres bandas antigénicas de diferente intensidad (100, 60 y 50 kDa, trazos a la izquierda del canal E, Figura 4C), otro para los amastigotas control que muestra dos bandas antigénicas intensas y bien definidas (110 y 80 kDa, flechas blancas a la izquierda del canal A, Figura 4C) y un tercer perfil caracterizado por cuatro bandas antigénicas, una ancha e intensa y tres de poca intensidad (100, dupleta 67/65, 60 y 50 kDa, puntas de flecha canal 0, Figura 4C) que se mantiene su expresión desde el día 0 al 12 de la curva de crecimiento (canales 0, 2, 4, 6, 8 y 12, Figura 4C).

Tres de los antígenos que el antisuero identifica en los parásitos de 0 a 12 días (100, 60 y 50 kDa), corresponden a los antígenos revelados en los epimastigotas control. En los parásitos de la condición horizontal, el anticuerpo IgY reveló cuatro bandas (100, dupleta 67/65, 60 y 50 kDa, puntas de flecha canal 0, Figura 4D) idénticas a las reveladas en la condición vertical (Figura 4C). Es de hacer notar que el anticuerpo IgY anti-AES no identificó en parásitos de la condición vertical y horizontal ningún antígeno de los revelados en los amastigotas controles.

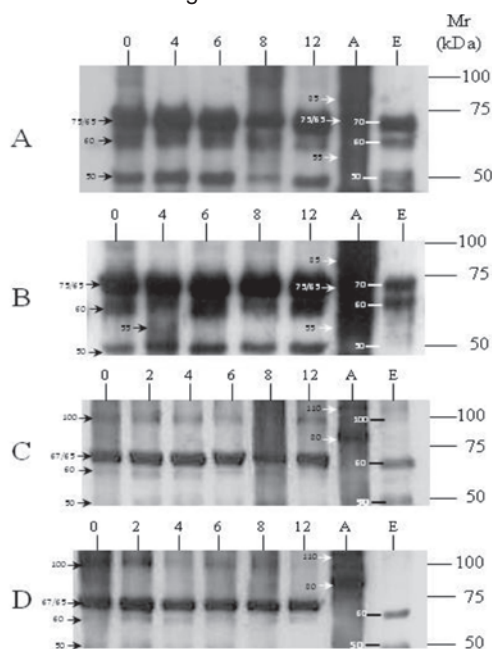


Figura 4. Western Blot (SDS-PAGE 10%) de los cambios antigénicos que ocurren en *Trypanosoma cruzi* (EPm6) durante el crecimiento en medio LITB a 27°C en condición vertical (A y C) y horizontal (B y D), revelados con suero de conejo anti-AES (A y B, 1/3000) y conjugado anti-IgG peroxidasa de conejo (1/10000) e IgY anti-AES (C y D, 1/1000) y conjugado anti-IgY peroxidasa de gallina (1/10000). Los números 0, 4, 6, 8, y 12 días corresponde al tiempo de incubación en medio LITB. Los canales A y E corresponden a los antígenos de Amastigotas y Epimastigotas control, respectivamente. Los números al lado derecho corresponden a la movilidad relativa (Mr) de los marcadores de peso molecular en kDa

DISCUSIÓN

En este trabajo se evidenció que las formas epimastigotas de *T. cruzi* crecidas en un microambiente con alta tensión de oxígeno se adaptan morfológica y molecularmente de forma tal que mimetizan algunas propiedades biológicas y antigénicas del estadio amastigota pero son básicamente formas epimastigotas redondas y no amastigotas genuinos.

En la revisión bibliográfica no se encontraron reportes de cultivos de *T. cruzi* en ambientes equivalentes a la condición horizontal (amplia superficie y poca altura del medio sobrenadante) y si bien no se determinó experimentalmente la TOD, es obvio que en la condición horizontal hay una mayor difusión de oxígeno al medio que en la vertical. La TOD es fundamental para el crecimiento y sobrevivencia de los linajes celulares mantenidos *in vitro*. Concentraciones de O₂ en el medio menor que 2% de la tensión de oxígeno atmosférica, llevan al cese del crecimiento celular, mientras que exceso de oxígeno disuelto en el medio (95%) es tóxico para células en cultivo (18). El estudio del contenido de oxígeno pericelular en cultivos de diferentes linajes celulares mostró que varía en un amplio rango (110 y 0,2 mm de Hg) y depende de la línea celular en cuestión (19). Se ha reportado que *T. cruzi* creciendo en erlenmeyer con agitación, alcanza mayores rendimiento de parásitos/mL indicando que a mayor TOD se acorta el tiempo de generación del parásito (20). Nuestros resultados indican que trabajando con igual inóculo, medio y volumen, y cultivando los parásitos en una condición con mayor TOD hay incremento exponencial del inóculo respecto al cultivo en baja TOD, sugiriendo un aumento en la velocidad de crecimiento (Tabla 1). Esto puede ser debido a que siendo *T. cruzi* un fermentador-aeróbico al incubarlo en una condición de alto tenor de oxígeno usa principalmente un metabolismo oxidativo (21).

Hay evidencias indicando que *T. cruzi* responde a cambios morfológicos en respuesta a los cambios microambientales (7). Pan (22) desarrolló dos medios de cultivo para *T. cruzi*, el F-29 y el F-32 que difieren en la proporción de suero fetal bovino (SFB) y plasma de pollo. Por adaptación progresiva a diferentes temperatura desde 29,5°C hasta 35,5°C consiguió mantener por sub-cultivos sucesivos las formas amastigotas proponiendo que en el SFB existen uno o varios factores involucrados en la morfogénesis hacia amastigotas y que la temperatura actúa como un mecanismo selectivo. Pan (22) hace notar que se debe mantener volúmenes pequeños de cultivo, para obtener reproducibilidad en las proporciones de amastigotas y tripomastigotas para inducir esos estadios de *T. cruzi* en los medios F-29 y F-32 (20). El hecho que estos amastigotas tengan una procedencia primaria desde epimastigotas a 28°C y no de tripomastigotas sanguíneos de 37°C como en el ciclo natural resta significación biológica a estos amastigotas. En nuestra condición horizontal encontramos formas redondas sin flagelo con aspecto de amastigotas (Figura 1) que son resistentes a complemento, en contraste con la morfología típica de epimastigotas sensibles a complemento de la condición vertical, lo que

indica que esas formas redondas a temperatura ambiente adquieren propiedades equivalentes a los amastigotas de 37°C.

Los cambios morfológicos durante las curvas de crecimiento están acompañados con cambios moleculares. Así, en la condición horizontal los días 4, 8 y 12, tanto en proteínas como en glicoproteínas, es donde se aprecian los cambios más significativos (Figuras 2B y 3B) y corresponden a predominio de las formas redondas (día 4), predominio de metacíclicos (día 8) y donde los porcentajes de las tres morfologías (epimastigotas, formas redondas y metacíclicos) son equitativos (día 12). En apoyo de esta afirmación se aprecia que en condición vertical el perfil del día 0 se conserva sin cambios significativos hasta el día 8, a partir del cual se notan algunos cambios menores concomitantemente con el incremento del porcentaje de metacíclicos (Figuras 2A y 3A, Tabla 1). En consecuencia los cambios morfológicos, la mayor tasa de multiplicación y la resistencia al complemento inducidos por una mayor TOD, no son un artefacto metodológico sin significado biológico sino que implican que en las formas redondas se están expresando genes de otros estadios del parásito.

Si las formas redondas que aparecen en la condición horizontal son efectivamente amastigotas es de esperar que expresen antígenos amastigota específicos. Se acepta que la expresión del antígeno amastigota específico ssp-4 de *T. cruzi* en una morfología de transición, valida su condición de amastigota (23). Reportes previos trabajando con sueros anti-estadios mostraron que el suero anti-AES detectó al menos catorce (175, 135, 120, 105, 95, 75, 72, 64, 60, 55, 51, 47 y 12/5 kDa) bandas antigénicas comunes y específicos de amastigotas intra y extracelulares (24). Durante la epimastigogénesis de *T. cruzi*, se identificó una morfología de transición como amastigota usando el anticuerpo IgY anti-AES, el cual mostró una alta capacidad discriminante y reconoció cinco bandas antigénicas (130, 110, 95, 80, y 52 kDa) como específicas de amastigotas (8). Como en los parásitos creciendo en la condición vertical no hubo cambios morfológicos durante toda la curva de crecimiento, era de esperar que el suero anti-AES no revelara ningún cambio antigénico y detectara los antígenos comunes con los epimastigotas controles (70, 60 y 50 kDa). En la condición horizontal donde si hubo cambios morfológicos, los perfiles antigénicos revelados confirman que los antígenos reconocidos por el suero anti-AES fueron mayoritariamente los comunes entre amastigotas (dupleta 75/65 kDa) y epimastigotas (70, 60 y 50 kDa). Sin embargo, el antígeno de 55 kDa revelado solo en los amastigotas controles, aparece tenue y transitoriamente en los parásitos del día 4, sugiriendo que al menos transitoriamente coincidieron características morfológicas, biológicas y antigénicas del estadio amastigotas en parásitos sometidos a una alta TOD.

Los resultados obtenidos con el anticuerpo IgY anti-AES confirman su alta capacidad discriminante al no revelar en los amastigotas controles, antígenos comunes con los

epimastigotas controles. El hecho que la IgY anti-AES no encontrara diferencias a lo largo de la curva de crecimiento de la condición horizontal y que sea idéntico el perfil a la condición vertical indica que esas formas redondas son esencialmente epimastigotas.

En conjunto estas evidencias sugieren que *T. cruzi* posee una plasticidad morfogenética para adaptarse a un microambiente determinado, mimetizando propiedades biológicas y antigénicas de otro estadio.

Agradecimiento: Al Sr. Jhonny Albanese por la asistencia infraestructural.

Financiamiento: FONACIT S1-2001000683; CDCH-UC FCS: Proyectos 2003-005; 2006-006; 00212-07; 2010-001; Investigaciones Menores 021-2013; 011-2011; 180-2011; 0394-2010, 0461-2010; Equipamiento Institucional 2005-012.

REFERENCIAS

1. Chang SL, Negherbon WO. Studies on haemoflagellates. II. A study of the growth rates of *Leishmania donovani*, *Leishmania brasiliensis*, *Leishmania tropica* and *Trypanosoma cruzi* in culture. J Infect Dis. 1947; 80(2):172-184.
2. Goitia-Aular M, Boiso JF. Cultivo de *Trypanosoma cruzi* (cepa Elpidio Padrón) en un medio semidefinido. Efecto de algunas variaciones en la composición y condiciones del mismo. Acta Cient Venez. 1982; 33(6):488-496.
3. Tyler KM, Engman DM. The life cycle of *Trypanosoma cruzi* revisited. Int J Parasitol. 2001; 31(5-6):472-481.
4. Cross GAM, Manning JC. Cultivation of *Trypanosoma brucei* spp in semi-defined and defined media. Parasitology. 1973; 67(3):315-331.
5. Ellenbogen BB, Hutner SH, Tamburro KM. Temperature-enhanced osmotic growth requirement of *Crithidia*. J Protozool. 1972; 19(2):349-354.
6. Andrade PP y Almeida DF. Environmental factors determining structural transition in *Herpetomonas samuelpeesoai*. J Parasitol. 1980; 66(2):250-254.
7. Contreras VT, De Lima AR, Navarro MC. Revisión: Morfogénesis de *Trypanosoma cruzi*: factores relevantes para la diferenciación *in vitro*. Acta Biol Venez. 2006; 26(2):49-60.
8. Graterol D, Arteaga RY, Navarro MC, Domínguez MI, De Lima AR, Contreras VT. El estadio amastigota precede la evolución del epimastigota durante la epimastigogénesis *in vitro* de *Trypanosoma cruzi*. Rev Soc Venez Microbiol. 2013; 33(1):72-79.
9. Pan SC. *Trypanosoma cruzi*: Ultrastructure of morphogenesis *in vitro* and *in vivo*. Exp Parasitol. 1978; 46(1):92-107.
10. Zaidenberg A, Tournier HA, Schinella GR, Buschiazzo HO. *Trypanosoma cruzi*: Obtención de amastigotes extracelulares y estudio de su crecimiento en diferentes condiciones de cultivo. Rev Latinoam Microbiol. 2000; 42(1):21-26.
11. Schuster FL, Sullivan JJ. Cultivation of clinically significant hemoflagellates. Clin Microbiol Rev. 2002; 15(3):374-389.

12. Contreras V. Factores importantes en el estudio de la relación parásito-huésped. Virulencia de 4 aislados de *Trypanosoma cruzi*. En: Vicerrectorado Académico Universidad de Carabobo Editores. Elementos de apoyo para trabajar en enfermedad de Chagas. 1er. Ed. Clemente Editores. Valencia Venezuela 1994; p 11-40.
13. Navarro MC, De Lima AR, Askue J, Contreras VT. Morphological comparison of axenic amastigogenesis of trypomastigotes and metacyclic forms of *Trypanosoma cruzi*. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2003; 98(1):83-91.
14. Carvalho ALM. Estudos sobre a posição sistemática, a biologia e a transmissão de tripanosomatídeos encontrados em *Zelus leucogrammus* (Perty, 1834) (Hemiptera, Reduviidae). Rev Pat Trop. 1973; 2:223-274.
15. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature. 1970; 227(5259):680-685.
16. Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. Proc Natl Acad Sci USA 1979; 76(9):4350-4354.
17. Barrios JG, Contreras O, Graterol D, Navarro MC, Contreras VT, De Lima AR. *Trypanosoma cruzi*: Epimastigogénesis en condiciones axénicas. Cambios morfológicos, peptídicos, glicopeptídicos y antigénicos. Acta Cient Venez. 2008; 59(1):29-38.
18. Nahapetian AT, Thomas JN, Thilly WG. Optimization of environment for high density Vero cell culture: effect of dissolved oxygen and nutrient supply on cell growth and changes in metabolites. J Cell Sci. 1986; 81:65-103.
19. Metzén E, Wolff M, Fandrey J, Jelkmann W. Pericellular PO₂ and O₂ consumption in monolayer cell cultures. Respir Physiol. 1995; 100(2):101-106.
20. Evans DA. Methods of cultivating parasites *in vitro*. In Taylor AER and Baker JR, Editors. Kinetoplastida. 1r Ed. Academic Press Inc, London 1978; p 55-88.
21. Engel JC, Franke de Cazzulo BM, Stoppani AO, Cannata JJ, Cazzulo JJ. Aerobic glucose fermentation by *Trypanosoma cruzi* axenic culture amastigote-like forms during growth and differentiation to epimastigotes. Mol Biochem Parasitol. 1987; 26(1-2):1-10.
22. Pan CT. Cultivation and morphogenesis of *Trypanosoma cruzi* in improved liquid media. J Protozool. 1971; 18(4):556-560.
23. Andrews NW, Hong KS, Robbins ES, Nussenzweig V. Stage-specific surface antigens expressed during the morphogenesis of vertebrate forms of *Trypanosoma cruzi*. Exp Parasitol. 1987; 64(3):474-484.
24. Contreras VT, Navarro MC, De Lima AR, Arteaga R, Duran F, Askue J, Franco Y. Production of amastigotes from metacyclic trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi*. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2002; 97(8):1213-1220.



UNIVERSIDAD DE CARABOBO

CONSEJO DE DESARROLLO CIENTÍFICO, HUMANÍSTICO Y TECNOLÓGICO (CDCH)

Valencia - Venezuela



El Consejo de Desarrollo Científico, Humanístico y Tecnológico de la Universidad de Carabobo (CDCH) es el organismo que se encarga de administrar el presupuesto destinado a la actividad de investigación en todos los campos de las ciencias exactas, aplicadas, sociales y tecnológicas.

Las modalidades de subvenciones se hacen bajo las siguientes áreas:

- Ayudas menores para la realización de Tesis, Trabajos de Pre y Postgrado.
- Proyectos individuales y grupales.
- Equipamientos institucionales.
- Organización de eventos institucionales e interinstitucionales.
- Asistencia a eventos nacionales e internacionales.
- Publicaciones de periódicos y libros.
- Publicaciones de artículos en revistas especializadas.
- Entrenamientos cortos a personal de investigación.

Dirección CDCH: Av. Bolívar Norte, C.C.P. Camoruco, piso 11. Valencia, Edo. Carabobo. Teléfonos: (0241) 823.9414 - 823.6735 - 821.0137

Epimastigogénesis de *Trypanosoma cruzi* Dm28c en medio ML15-HA: Análisis proteico, glicoproteico y antigénico.

Diana Graterol, Dioglenny Ramírez, Andrea Ramos, Rosa Yanet Arteaga, Oriana Mundaray, Wilmer Pineda, María Consuelo Navarro, María Isabel Domínguez, Ana Rita De Lima, Víctor Tulio Contreras

RESUMEN

El medio ML15-HA permite simular *in vitro* los eventos morfogenéticos del ciclo vital de *T. cruzi*. Se ha evidenciado que los cambios morfológicos de la epimastigogénesis del clon Dm28c de *T. cruzi* en ML15-HA, ocurren más rápidamente que para otros aislados. Nuestro propósito fue investigar si los cambios macromoleculares ocurren concomitantemente con la rápida transformación morfológica. Tripomastigotas derivados de células infectadas se incubaron por diferentes tiempos en medio ML15-HA a 27°C. Los cambios morfológicos se determinaron por microscopía de contraste de fases y coloración con Giemsa. Los perfiles peptídico y glicopeptídico se analizaron mediante SDS-PAGE y coloraciones específicas. Los cambios antigénicos se estudiaron mediante Western blot usando sueros anti-Tripomastigotas y anti-Epimastigotas. Los resultados muestran: (1) caída del porcentaje de tripomastigotas e incremento de amastigotas en las primeras 24 horas, con incremento gradual de epimastigotas a partir de 48 horas; (2) tres perfiles peptídicos y glicopeptídicos diferentes: tripomastigotas, epimastigotas a partir del día 4, y un perfil intermedio los días 2 y 3, demostrando la estrecha correlación entre los eventos morfológicos y los cambios proteicos y glicoproteicos; (3) los perfiles antigénicos revelaron estrecha relación entre los cambios morfológicos y la expresión de antígenos estadio-específicos. Los resultados obtenidos evidencian de manera concluyente que los cambios moleculares son más acelerados para el clon Dm28c en medio ML15-HA que en otros medios. Estos hallazgos abren la interrogante, si la velocidad de la epimastigogénesis está determinada por la constitución genética del aislado o por la riqueza nutricional del medio de diferenciación.

Palabras Clave: *Trypanosoma cruzi*, Medio ML15-HA, Epimastigogénesis.

ABSTRACT

***Trypanosoma cruzi* Dm28c Epimastigogenesis in ML15-HA medium: protein, glycoprotein and antigen analyses**

The ML15-HA medium allows simulate *in vitro* morphogenetic events in the life cycle of *T. cruzi*. It has been demonstrated that the morphological changes of epimastigogenesis in ML15-HA

of the *T. cruzi* clone Dm28c, occur faster than for other isolates. Our purpose was to investigate whether macromolecular changes occur concomitantly with rapid morphological transformation. Trypomastigotes derived from infected cells were incubated for different times in ML15-HA medium at 27°C. Morphological changes were determined by phase contrast microscopy and staining with Giemsa. Peptide and glycopeptide profiles were analyzed by SDS-PAGE and specific staining. Antigenic changes were studied by Western blot using serum anti-trypomastigotes and anti-epimastigotes. The results show: (1) decline in the percentage of trypomastigotes and amastigotes increased in the first 24 hours, epimastigotes gradually increases from 48 hours, (2) three peptide and glycopeptide profiles different: trypomastigotes, epimastigotes from the day 4 and an intermediate profile on days 2 and 3, showing the close correlation between morphological events and protein and glycoprotein changes, (3) antigenic profiles showed close relationship between the morphological changes and the expression of stage-specific antigens. The results show conclusively that the molecular changes are more rapid for clone Dm28c in ML15-HA medium than in other media. These findings open the question, if the epimastigogenesis speed is determined by the genetic constitution of isolated or nutritional wealth differentiation medium.

Key Words: *Trypanosoma cruzi*, Epimastigogenesis, ML15-HA medium.

INTRODUCCION

El estudio de los cambios moleculares que ocurren durante la transformación morfológica de los estadios del ciclo vital del *Trypanosoma cruzi*, agente causal de la Tripanosomiasis Americana, es importante para implementar medidas racionales en el combate de la enfermedad de Chagas. *T. cruzi* durante su ciclo evolutivo muestra cuatro estadios morfológica y fisiológicamente distinguibles, resultado de los procesos de diferenciación que ocurren en el vector y el hospedador vertebrado. Así, los epimastigotas se transforman en metacíclicos por el proceso de metacicloogénesis (1,2), los metacíclicos en amastigotas por amastigogénesis primaria (3), los tripomastigotas sanguíneos en amastigotas por amastigogénesis secundaria (4) y los tripomastigotas sanguíneos en epimastigotas por la epimastigogénesis que ocurre en el tracto intestinal del insecto vector.

Los procesos de transformación morfológica y molecular de *T. cruzi* pueden ser estudiados *in vitro* e *in vivo*, en parásitos mantenidos bajo condiciones controladas en el laboratorio simulando los eventos que ocurren en la naturaleza (5-7), se ha demostrado que factores como temperatura, pH, tensión de oxígeno y estrés nutricional disparan esos procesos de diferenciación (5,8-9). Sin embargo, no se encontraron estudios comparando la cinética de transformación

Laboratorio de Protozoología. Instituto de Biología Molecular de Parásitos (BioMolIP). Facultad de Ciencias de la Salud. Universidad de Carabobo. Venezuela.

Correspondencia: Diana I. Graterol R.

E-mail: dianagraterol@hotmail.com

morfológica ni molecular entre aislados de diferentes fuentes epidemiológicas en un medio de cultivo común que permita simular *in vitro* todos los procesos de diferenciación. Llama la atención que en la bibliografía consultada no se hayan reportado estudios indicando que en una especie, un mismo proceso de diferenciación ocurra a velocidades diferentes.

Gigante y Contreras (10,11) trabajando con el clon Dm28c de *T. cruzi* procedente de un rabipelado (reservorio de la enfermedad de Chagas), caracterizado parasitológicamente y perteneciente al linaje filogenético Tc1 (12,13), quien además es modelo de referencia para estudios de morfogénesis (14), estandarizaron su cultivo y condiciones de diferenciación en medio ML15-HA (10,11); un medio base que se emplea rutinariamente para cultivo de células embrionarias de insecto (15). Ellos estandarizaron las condiciones para inducir tres de los cuatro procesos de morfogénesis del ciclo vital de *T. cruzi* y evidenciaron que la epimastigogénesis del clon Dm28c de *T. cruzi* también cursa con la aparición de una morfología de transición previo a su diferenciación en epimastigota, como había sido previamente reportado para otros aislados en otros medios de diferenciación (16,17). Gigante y Contreras (10,11) además evidenciaron que los eventos morfológicos ocurren muy rápidamente en medio ML15-HA. De ahí el interés de estudiar los eventos a nivel molecular que ocurren en el clon Dm28c para examinar si los cambios proteicos, glicoproteicos y antigénicos ocurren concomitantemente con los cambios morfológicos.

MATERIALES Y METODOS

Parásitos y estadios: Se trabajó con el clon Dm28c de *T. cruzi* aislado por hemocultivo de un rabipelado (*Didelphis marsupialis*) en el año 1976 como descrito previamente (12) y mantenido en *Rhodnius prolixus* con pases trimestrales en ratón. En los experimentos se emplearon parásitos con no más de tres meses en cultivo, con repiques semanales en medio ML15-HA (18,19). Los estadios utilizados fueron: tripomastigotas sobrenadantes de cultivos celulares (equivalentes a tripomastigotas tipo hemático) y epimastigotas procedentes de cultivo axénico, crecidos durante 6 días a 27°C en medio ML15-HA como control de la epimastigogénesis.

Epimastigogénesis inducida en medio ML15-HA pH 7,0:

Para estudiar la cinética de transformación de tripomastigotas a epimastigotas se emplearon tripomastigotas sobrenadantes de células Vero infectadas incubados en medio ML15-HA pH 7,0 (Base de medio L-15 comercial suplementado 1:1 con solución de Triptosa-Fosfato Glucosado, 5% Suero Fetal Bovino (SFB), 20 mmol/L Hemina y antibióticos 100 U/mL de Penicilina y 100 µg/mL de Sulfato de Estreptomina), siguiendo el protocolo descrito por Barrios et al y Gigante et al (17,10). Se colocaron 1×10^7 tripomastigotas/mL incubados a 27°C en una batería de tubos cónicos estériles de 15 mL con 4 mL del medio ML15-HA (10,11). Para analizar la cinética de transformación se procedió a la obtención de masas de parásitos los días 0, 1/3, 1, 2, 3, 4, 6, 8 y 10 para obtención de proteínas y glicoproteínas. Como condición control se emplearon epimastigotas de 6 días de cultivo mantenidos en el mismo medio por varias semanas.

Se hizo recuento diferencial de alícuotas de cada día de la cinética, bajo microscopía de contraste de fases para estimar (a) incremento del inóculo (N_t/N_0); (b) porcentaje de tripomastigotas; (c) porcentaje de formas en diferenciación; (d) porcentaje de amastigotas; (e) porcentaje de epimastigotas y (f) porcentaje de formas inmóviles. La morfología de los parásitos se estudió en láminas coloreadas con Giemsa-ácido (20), con un aumento final de 1000X en microscopio óptico (Nikon, Eclipse 400) contando al menos 300 formas para determinar porcentajes morfológicos. Las morfologías más representativas se fotografiaron con cámara digital (Nikon, Coolpix, 4500).

Obtención de las fracciones proteicas totales: Masas húmedas de peso conocido se lisaron por criólisis hipotónica en agua suplementada con una mezcla de inhibidores de proteasas (trans-epoxi-succinil-L-leucilamido-4-guanidino-butano [E-64] 0,1 mmol/L; N α -p-tosil-L-cloro-lisina metil cetona [TLCK] 0,5 mmol/L; N-p-tosil-L-fenilalanina clorometil cetona [TPCK] 0,5 mmol/L y fenantrolina 1 mmol/L) en relación de 300 mg parásitos/mL de solución de lisis. Se sometieron a tres ciclos de congelación/descongelación (-20°C / 37°C), alternando con agitación en vórtex (3 min a temperatura ambiente). Los lisados se sedimentaron a 14.000 xg 10 min a 4°C y los sobrenadantes se suplementaron a 150 mmol/L NaCl (21). La concentración de proteínas se determinó mediante Coomassie Plus-200 (Pierce, Rockford) según protocolo del fabricante usando Seroalbúmina Bovina (BSA) en un rango de 50 a 250 µg de proteína/mL y se leyó la absorbancia a 595 nm en un espectrofotómetro Ultrospect 3000 (Pharmacia).

Análisis proteico, glicoproteico y antigénico durante la epimastigogénesis:

Tripomastigotas sobrenadantes de células Vero, epimastigotas de medios axénicos y formas en diferenciación se analizaron por electroforesis bajo condiciones reductoras en mini-geles de poliacrilamida al 10% en presencia de dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE) (22), colocando 8 y 10 µg de proteína por canal para visualizar proteínas y glicoproteínas, respectivamente, y 4 µg para antígenos. Se incluyó un canal con proteínas marcadoras de peso molecular conocido (Promega, V-8491).

Para el análisis de glicoproteínas se incluyó un canal adicional con marcadores de referencia para carbohidratos (dilución ¼ de 0,5 µg de Fetúina de suero fetal bovino [Sigma, F-2379]; 1,5 µg de α 1-ácida-glicoproteína [Sigma, G-9014] y 1,5 µg de Mucina de glándula sub-maxilar de buey [Sigma, M-3895]). La electroforesis se desarrolló a corriente constante de 12 mAmp y a temperatura ambiente. Las proteínas separadas en los geles se visualizaron mediante coloración combinada de Coomassie-Plata (23) y las glicoproteínas según la técnica combinada de Ácido Periódico-Alcian Blue-Glutaraldehído-Plata (APABGP) (24,25).

El análisis antigénico se hizo mediante electroinmunotransferencia (26) a membranas de nitrocelulosa (MNC, Pierce). Los antígenos se revelaron usando sueros hiperinmunes anti-tripomastigotas (Anti-T) y anti-epimastigotas (Anti-E) preparados en conejos (27)

diluidos 1/2000. Se usaron como anticuerpos secundarios anti-IgG de conejo producida en cabra (1/3000) conjugadas a peroxidasa (Sigma, A-0545).

Los inmunocomplejos formados se revelaron mediante quimioluminiscencia empleando como sustrato luminol (Super Signal, Pierce) según protocolo del fabricante. Los geles fueron secados entre hojas de papel celofán y para obtener los luminogramas, las MNC se cubrieron con lámina de vinilo transparente y se expusieron a películas de Rayos X (Medical Film Konica Minolta).

Digitalización, registro fotográfico y análisis: Los geles y luminogramas se digitalizaron en densitómetro (Scanner Bio-Rad Imaging Densitometer, Modelo GPS-690) y analizaron con el Software (Bio-Rad Molecular Analyst®/PC 1,2 Software package). Las figuras y fotografías se procesaron por Microsoft Power Point 2007.

RESULTADOS

La Tabla 1 muestra los cambios morfológicos y poblacionales que ocurren durante la epimastigogénesis de *T. cruzi* (Dm28c) en medio ML15-HA pH 7,0 a 27°C, expresados como porcentaje de formas (tripomastigota, en diferenciación, amastigota, epimastigota y formas inmóviles) e incremento del inóculo (N_t/N_0). Se aprecia que los cambios más significativos ocurren en las primeras 24 horas con una caída abrupta del porcentaje de tripomastigotas (de 94,8 a 3,9%), un incremento concomitante de los amastigotas (de 0 a 89,4%) y sin incremento poblacional neto ($N_t/N_0=1$).

En términos poblacionales, se observa que el inóculo se incrementa progresivamente desde 1,8 hasta 59,0 entre el día 2 y el día 10, lapso en el cual ocurre un incremento progresivo del porcentaje de epimastigotas, que se establecen como morfología predominante a partir del día 2 de la cinética hasta el día 8 (de 25,0% a 85,8%).

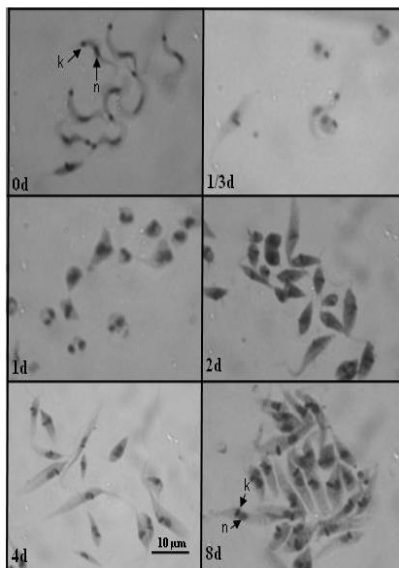


Figura 1. Cambios morfológicos durante la epimastigogénesis de *T. cruzi* (Dm28c) en medio ML15-HA pH 7,0 a 27°C. Los números corresponden a tiempo en días. n = núcleo; k = kinetoplasto. Coloración de Giemsa-ácida (1000X).

La Figura 1 muestra estos cambios por microscopía óptica, donde se aprecia la transformación de tripomastigotas en amastigotas al primer día de incubación y la transformación de amastigotas en epimastigotas a partir del segundo día (2d) con predominio de los epimastigotas a los 4 y 8 días (4d y 8d). Entre las 8 horas (1/3d) y 24 horas (1d) se observan formas redondeadas en diferenciación entre los tripomastigotas alargados y los amastigotas redondos, hasta alcanzar la morfología típica del amastigota con kinetoplasto en barra. A partir del día 2 aparecen epimastigotas cortos (2d) que incrementan su tamaño y se mantienen como morfología predominante (epimastigotas típicos) hasta el 8vo día de incubación.

La Figura 2 muestra perfiles proteicos y glicoproteicos diferentes: uno para tripomastigotas (T, Panel A y B) y otro para epimastigotas (E, Panel A y B). Durante la diferenciación (canales 1/3 al 10) se aprecian cambios tanto en las proteínas (Panel A) como en las glicoproteínas (Panel B). El perfil epimastigota específico se observa a partir del día 4 de incubación de los tripomastigotas, compatible con el incremento progresivo de la morfología epimastigota (Tabla 1). En las proteínas, las mayores modificaciones están representadas por la distribución, cambios de intensidad y presencia de polipéptidos transitorios de alto peso molecular (por encima del marcador de 100kDa) antes del día 3 y cambios en los de mediano y bajo peso molecular a partir del día 4 (por debajo del marcador de 75 kDa); lo que indica que a partir de ese día, el perfil proteico es semejante al estadio epimastigota y que en los primeros días, el perfil es semejante al estadio tripomastigota. En las glicoproteínas, durante la diferenciación (canales 1/3 al 10) se logra evidenciar cambios de espesor y de intensidad de algunos glicopéptidos, lo que sugiere la existencia de regiones de re-arreglos glicopeptídicos. Parecido a lo que se observa con las proteínas a partir del día 4 de incubación, los parásitos muestran un perfil glicopeptídico similar al de los epimastigotas controles compatible con el incremento progresivo de la morfología epimastigota.

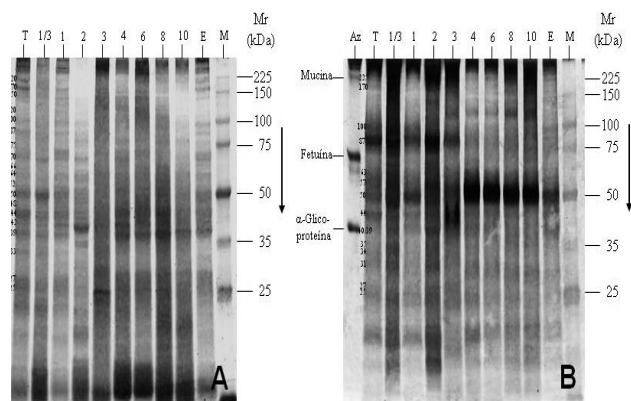


Figura 2. Electroforesis (SDS-PAGE 10%) de los cambios polipeptídicos que ocurren en *T. cruzi* (Dm28c) durante la epimastigogénesis en medio ML15-HA pH 7,0 a 27°C, teñidos con Coomassie-Plata (Panel A, 8 µg) y APABGP (Panel B, 10 µg). "T" corresponde a tripomastigotas y "E" a epimastigotas. Los números en la parte superior corresponden al tiempo de incubación en el medio ML15-HA pH 7,0. Az = 1,5 µg de mezcla de glicoconjugados. El canal "M" corresponde a los marcadores peptídicos de peso molecular y "Mr" a la movilidad relativa en kiloDaltons (kDa).

TABLA 1. Distribución porcentual de formas estructurales de *Trypanosoma cruzi* (Dm28c) durante la incubación a diferentes tiempos de tripomastigotas sobrenadantes de células en medio ML15-HA pH 7,0 a 27°C.

Tiempo (días)	Porcentaje de Formas					N _t /N ₀
	T	D	A	E	Muertos	
0	94,8	0	0	5,1	0	1,0
1/3	14,8	0	74,3	10,8	0	-
1	3,9	2,6	89,4	3,9	0	1,0
2	0	28,6	45,4	25,0	0	1,8
3	0,8	7,1	33,9	58,0	0	2,9
4	1,6	11,9	15,0	71,4	0	6,5
6	0	6,8	8,4	84,7	0	15,1
8	0	6,8	3,9	85,8	3,3	45,1
10	0	1,7	1,7	82,6	13,9	59,0

T= Tripomastigotas; D= Formas en diferenciación; A= Amastigotas; E= Epimastigotas; Muertos= formas inmóviles. N_t/N₀= la relación entre el recuento de parásitos/mL a tiempo (t) sobre el recuento a tiempo 0.

Las Figuras 3 y 4 muestran los análisis por Inmunobloting de los perfiles antigénicos revelados por los sueros de conejo Anti-T y Anti-E durante la epimastigogénesis de *T. cruzi* (Dm28c) en medio ML15-HA pH 7,0. El suero Anti-T (Figura 3) revela 3 perfiles bien definidos: un primer perfil correspondiente a tiempo 1/3d y 1d similar al de tripomastigotas (canal T); un perfil entre el día 3 y 10 similar al perfil de epimastigotas (canal E); y un perfil de transición correspondiente al día 2 con bandas antigénicas compartidas de tripomastigotas y epimastigotas (canales T y E) y un antígeno de 80 kDa (punta de flecha blanca) ausente en los tripomastigotas y los epimastigotas.

En el canal T correspondiente a los tripomastigotas, el suero Anti-T reconoce una región de antígenos no resueltos por encima del marcador de 150 kDa (asterisco a la izquierda del canal T) y ocho bandas antigénicas de diferente intensidad y espesor por debajo del marcador de 150 kDa (134, 114, 100, 88, dupleta 75/72, dupleta 61/60, dupleta 51/49 y tripleta 47/45/43 kDa) distribuidos entre los marcadores 150 y 25 kDa y un antígeno intenso por debajo del marcador de 25 kDa, mientras que en el canal E correspondiente a los epimastigota de la condición control, el suero Anti-T reveló ocho bandas antigénicas de diferente intensidad y espesor (125, 114, dupleta 100/95, 88, tripleta 75/69/66, 60, 53 y dupleta 50/47 kDa, punta de flecha a la izquierda del canal E) y un antígeno intenso por debajo del marcador de 25 kDa.

El suero Anti-E (Figura 4) revela también 3 perfiles bien definidos similar a lo observado con el suero Anti-T y un antígeno de 60 kDa (punta de flecha blanca a la izquierda del canal 2) ausente en los tripomastigotas y los epimastigotas. El suero Anti-E reconoce en su antígeno homólogo, un perfil antigénico complejo caracterizado

por una banda ancha de antígenos no resueltos entre 56 y 30 kDa (punta de flecha a la derecha del canal E) y una banda (tripleta 82/72/67, asterisco a la derecha del canal E). En el canal T, el suero Anti-E reconoce ocho bandas antigénicas de diferente intensidad (225, 150, 118, dupleta 90/80, dupleta 75/69, 61, tripleta 56/52/49 y 44 kDa) distribuidos entre los marcadores 225 y 25 kDa. La comparación de estos perfiles muestra al menos cuatro bandas antigénicas comunes a ambos estadios (dupleta 75/69, 61, tripleta 56/52/49 y 44 kDa, punta de flecha a la derecha del canal T) los cuales mantienen su expresión durante toda la diferenciación (canales 1/3 al 10).

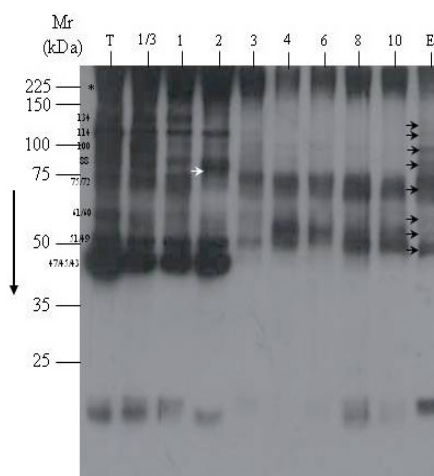


Figura 3. Inmunobloting (SDS-PAGE 10%) de los cambios antigénicos que ocurren en *T. cruzi* (Dm28c) durante la epimastigogénesis en medio ML15-HA pH 7,0 a 27°C, revelados con suero de conejo Anti-T (1/2000) como descrito en Materiales y Métodos. T= tripomastigotas y E= epimastigotas. Los números 1/3, 1, 2, 3, 4, 6, 8 y 10 días corresponde al tiempo de incubación (días) en el medio de diferenciación. Mr indica la movilidad relativa de los marcadores de peso molecular en kDa.

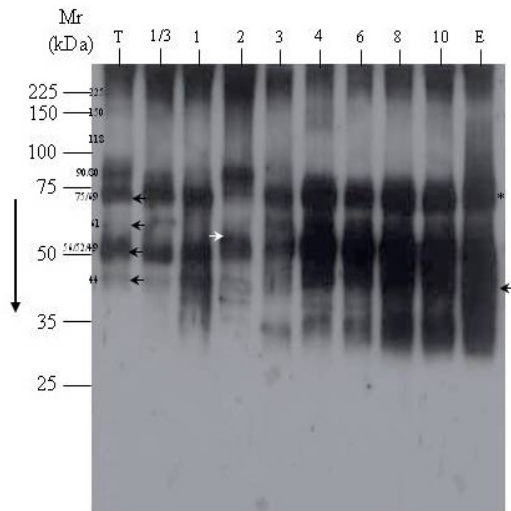


Figura 4. Inmunoblotting (SDS-PAGE 10%) de los cambios antigénicos que ocurren en *T. cruzi* (Dm28c) durante la epimastigogénesis en medio ML15-HA pH 7,0 a 27°C, revelados con suero de conejo Anti-E (1/2000) como descrito en Materiales y Métodos. T= tripomastigotas y E= epimastigotas. Los números 1/3, 1, 2, 3, 4, 6, 8 y 10 días corresponde al tiempo de incubación (días) en el medio de diferenciación. Mr indica la movilidad relativa de los marcadores de peso molecular en kDa.

DISCUSIÓN

En este trabajo se demuestra que los cambios macromoleculares durante la epimastigogénesis del clon Dm28c de *T. cruzi* en medio ML15-HA, ocurren simultáneamente con la transformación morfológica. Es de resaltar que se estudió la transformación del tripomastigota tipo sanguíneo con un parásito genéticamente homogéneo (clonado) en un medio de diferenciación (común) donde varios procesos de diferenciación fueron estandarizados.

A pesar que los estudios de morfogénesis de *T. cruzi* han sido realizados con aislados diferentes y/o medios de diferenciación diferentes, se ha propuesto que procesos de diferenciación de *T. cruzi* tales como metaciclogénesis, amastigogénesis y epimastigogénesis inducidos en condiciones axénicas son afectados por factores inherentes al aislado y al microambiente en el cual ocurre la diferenciación (5).

Barrios et al (17) estudiando la epimastigogénesis del clon EPM₆ de *T. cruzi* (procedente de humano) incubado en un medio semi-definido (MEMTAU pH 6,7) (3) suplementado con hidrolizado de lactoalbúmina (1X), mostraron que los parásitos en diferenciación pasan por formas redondeadas sin flagelo (amastigotas) y formas de naveta antes de transformarse en epimastigotas. En los primeros 2 días cayó el porcentaje de tripomastigotas y a partir del día 6 se incrementó progresivamente hasta 6 veces la población y los epimastigotas se hicieron predominantes. De Lima et al (16) en un estudio similar trabajando con el clon EPM₆ de *T. cruzi* e incubando en un medio no definido químicamente (medio LIT B pH 7,2) mostraron que los cambios morfológicos de los tripomastigotas se inician en las primeras 12 horas de incubación, con incremento progresivo de formas redondas a las 48 horas que alcanzan un pico máximo al

4to día de incubación. Los epimastigotas se incrementaron significativamente a partir del 6to día, alcanzando al día 12 de incubación cerca de un 98% de epimastigotas. Gigante et al (10) trabajando con el clon Dm28c aislado de reservorio en condiciones equivalentes e incubando en un medio semi-definido (ML15-HA pH 7,0), mostraron que los cambios más significativos ocurren en las primeras 24 horas con una caída abrupta del porcentaje de tripomastigotas (de 94,8 a 3,9%) y un incremento concomitante de los amastigotas (de 0 a 89,4%), mientras que los epimastigotas se establecieron como morfología predominante a partir del día 2 hasta el día 10, con un incremento de 59 veces el inóculo. Los resultados anteriores evidencian que indistintamente de la procedencia del aislado (humano o reservorio), los eventos de diferenciación que ocurren durante la epimastigogénesis son equivalentes y confirman la presencia del estadio amastigota precediendo al estadio epimastigota (6,28).

A nivel de proteínas y glicoproteínas, estudios previos del evento de transformación empleando otros aislados en medios diferentes muestran que los tripomastigotas expresan proteínas y glicoproteínas del epimastigota como demostrado por De Lima et al (16) trabajando con el clon EPM₆ de *T. cruzi* y medio LIT B y por Barrios et al (17) trabajando con el mismo clon y medio MEMTAU. Nuestros resultados para el clon Dm28c y medio ML15-HA pH 7,0 con 5% SFB que representa una condición de riqueza nutricional, muestran tres perfiles proteicos y glicoproteicos diferentes: uno para tripomastigotas entre las 0 y 24 horas de incubación; otro para epimastigotas a partir del día 4, comparable con el perfil control de epimastigotas, y un tercer perfil diferente para los días 2 y 3. Los mayores cambios fueron evidentes a partir de las 8 horas de incubación. Se aprecia la aparición de polipéptidos transitorios entre los días 1 y 2, lo que sugiere que en estas regiones está ocurriendo un re-arreglo polipeptídico que pudiera ser aportado por las formas amastigotas presentes en el cultivo durante este período.

El perfil epimastigota específico se observa a partir del día 4 de incubación, compatible con el incremento progresivo de la morfología epimastigota (Tabla 1), mucho más rápido que para otros aislados. Los cambios glicopeptídicos observados muestran que el perfil de los tripomastigotas es significativamente diferente del perfil de epimastigotas y que durante la cinética de diferenciación, entre los días 2 y 4 se evidencian cambios en el espesor y la intensidad de algunos glicopéptidos que sugieren la existencia de regiones de re-arreglos glicopeptídicos.

El análisis de los cambios antigénicos que ocurren durante la epimastigogénesis de Dm28c en ML15-HA, muestra una correlación entre los perfiles antigénicos de los estadios de partida (tripomastigotas) y de culminación (epimastigotas), y un perfil de transición con antígenos característicos: uno de 80 kDa, revelado por el suero Anti-T en parásitos del día 2 y otro de 60 kDa, revelado por el suero Anti-E también en parásitos del día 2. Llama la atención que no hay correspondencia entre el día de mayor porcentaje de amastigotas (día 1, Tabla 1) con la presencia de antígenos "específicos" (día 2), lo que podría sugerir que los cambios morfológicos preceden los cambios antigénicos. Un hecho irrefutable es que el perfil antigénico característico de los

epimastigotas puede ser revelado por ambos antisueros (Anti-T y Anti-E) tan precozmente como el día 3 de la incubación, indicando que la mayor velocidad en los cambios morfológicos parece estar asociado a los cambios moleculares. Vale destacar que estudios previos de diferenciación de *T. cruzi* proponen que la expresión génica antecede la transformación morfológica (1) en contraste con la sugerencia hecha para explicar el alto porcentaje de amastigotas (día 1) sin antígenos específicos. Hecho que destaca la importancia de esta investigación al trabajar en un medio de diferenciación común para varios procesos de transformación morfológica.

El análisis antigénico comparativo de la epimastigogénesis muestra que ensayos realizados en diferentes tiempos con aislados y condiciones diferentes, confirman los eventos fundamentales que ocurren durante la diferenciación. El estadio de partida (trypomastigota) y culminación (epimastigota) de la diferenciación muestran un perfil estadio-específico. Durante la diferenciación, aparece un perfil antigénico diferente compatible con la existencia del estadio amastigota precediendo al estadio epimastigota y este evento parece que puede ser adelantado o retardado en función de la riqueza nutricional del medio de diferenciación, aspecto que merece ser investigado. La definición del perfil molecular característico de los epimastigotas (proteico, glicoproteico y antigénico) ocurre cuando hay predominancia de ese estadio concomitantemente con el incremento poblacional. En términos de la utilidad para fines diagnósticos, es evidente la existencia de antígenos comunes indistintamente del aislado y del medio de diferenciación, lo que permite sugerir un análisis de estos eventos usando sueros de pacientes chagásicos donde las coincidencias tienen un mayor significado diagnóstico que el uso de anti sueros estadio-específicos producidos en conejos.

Finalmente, se abre una serie de interrogantes que deben ser consideradas, tales como si la velocidad de la epimastigogénesis está determinada por la constitución genética del aislado o por la riqueza nutricional del medio de diferenciación; ó si las cinéticas de otros eventos de diferenciación (Metaciclógenésis) son diferentes para aislados de diferente constitución genética.



AGRADECIMIENTOS. Al Sr. Jhonny Albanese por la asistencia infraestructural.

FINANCIAMIENTO. FONACIT S1-2001000683; CDCH-UC FCS: Proyectos 2003-005; 2006-006; 00212-07; 2010-001; Investigaciones Menores 021-2013; 011-2011; 180-2011; 0394-2010, 0461-2010; Equipamiento Institucional 2005-012.

REFERENCIAS

- Contreras VT, Morel CM & Goldenberg S. Stage specific gene expression precedes morphological changes during *Trypanosoma cruzi* metacyclogenesis. *Mol Biochem Parasitol.* 1985a; 14(1):83-96.
- Contreras VT, Salles JM, Thomas N, Morel CM & Goldenberg S. *In vitro* differentiation of *Trypanosoma cruzi* under chemically defined conditions. *Mol Biochem Parasitol.* 1985b; 16(3):315-327.
- Contreras VT, Navarro MC, De Lima AR, Arteaga R, Duran F, Askue J, et al. Production of Amastigotes from Metacyclic Trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi*. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2002; 97(8):1213-1220.
- Tomlinson S, Vandekerckhove F, Frevert U & Nussenzweig V. The induction of *Trypanosoma cruzi* trypomastigote to amastigote transformation by low pH. *Parasitology.* 1995; 110:547-554.
- Contreras VT, De Lima AR, Navarro MC. Morfogénesis de *Trypanosoma cruzi*: Factores relevantes para la diferenciación *in vitro*. *Rev Acta Biol Venez.* 2006; 26(2):49-60.
- Contreras V, Córdova A, Fernández K, Fernández A, De Lima AR, Domínguez MI, et al. Abordaje metodológico para estudiar la Epimastigogénesis *in vivo* de *Trypanosoma cruzi* en triatomíneos. *Acta Cient Venez.* 2009; 60(1):Resúmenes del Congreso. Memorias del LIX Convención anual de AsoVAC. 2009; Nov 15-20; Mérida, Venezuela. <http://www.asovacmerida.org.ve/pdf/resumen.pdf>.
- Contreras V, Arteaga R, Graterol D, Córdova A, Fernández K, Barrios L, et al. Epimastigogénesis *in vitro* and *in vivo* of *Trypanosoma cruzi*: Comparison of strains isolated from Triatomine, Opossum and Man. XXIII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Protozoologia / XXXIV Reunião Anual sobre Pesquisa Básica em Doença de Chagas. 2007; Nov 5-7; Caxambú – Minas Gerais, Brasil.
- De Souza W. From the cell biology to the development of new chemotherapeutic approaches against trypanosomatids: dreams and reality. *Kinetoplastid Biol Dis.* 2002; 1(1):3.
- Goldenberg S & Rodrigues Ávila A. Aspects of *Trypanosoma cruzi* stage differentiation. In: *Advanced in Parasitology. Chagas Disease.* Part A. Ed: Louis M. Weiss Herbert B. Tanowitz Louis V. Kirchoff. First Ed. Academic Press. Elsevier. 2011; 13(25):285-305.
- Gigante G, González G, Linares E. Epimastigogénesis, Metaciclógenésis, Amastigogénesis del clon Dm28c de *T. cruzi* en medio ML15-HA [Tesis de Grado para optar al título de Licenciado en Bioanálisis]. Universidad de Carabobo, Venezuela; 2009.
- Contreras V, Gigante G, González G, Linares E, Arteaga R, Graterol D, et al. Epimastigogénesis, Metaciclógenésis y Amastigogénesis de *Trypanosoma cruzi* clon Dm28c en medio ML15-HA. *Acta Cient Venez.* 2010; 61(1):50-51. Memorias del LX Convención anual de AsoVAC. 2010; Nov 14-19; Ciudad Bolívar, Venezuela. <http://www.asovacguayana.org.ve/>.
- Contreras VT, Araujo-Jorge TC, Bonaldo MC, Thomaz N, Barbosa HS, Meirelles MN, et al. Biological aspects of the Dm28c clone of *Trypanosoma cruzi* after metacyclogenesis in chemically defined media. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1988; 83(1):123-133.
- Barnabé C, Brenière SF. Eco-distribución de los clones de *Trypanosoma cruzi*. In: Alfred Cassab J.R., Noireau François, Guillen G. Chagas: La enfermedad en Bolivia: conocimientos científicos al inicio del Programa de Control (1998-2002). La Paz (BOL); La Paz: Ministerio de Salud y Previsión Social; IRD, 1999; 209-215.
- Krieger MA, Ávila AR, Yamada-Ogatta SF, Plazanet-Menut C, Goldenberg S. Differential gene expression during *Trypanosoma cruzi* metacyclogenesis. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1999; 94(1):165-168.

15. Lanar DE. Growth and differentiation of *Trypanosoma cruzi* cultivated with a *Triatoma infestans* embryo cell line. J Protozool. 1979; 26(3):457-462.
16. De Lima AR, Aparicio A, Berrocal A, Navarro MC, Graterol D, Contreras V. Epimastigogénesis de *Trypanosoma cruzi* en medio axénico: cambios peptídicos, glicopeptídicos y enzimáticos. Salus. 2007; 11(2):39-47.
17. Barrios JG, Contreras O, Graterol D, Navarro MC, Contreras VT, De Lima AR. *Trypanosoma cruzi*: Epimastigogénesis en condiciones axénicas. Cambios morfológicos, peptídicos, glicopeptídicos y antigénicos. Acta Cient Venez. 2008; 59(1):29-38.
18. Villalta F, Kierszenbaum F. Growth of isolated amastigotes of *Trypanosoma cruzi* in cell-free medium. J Protozool. 1982; 29(4):570-576.
19. Leibovitz A. The growth and maintenance of tissue/cell cultures in free gas exchange with the atmosphere. Am J Hyg. 1963; 78:173-180.
20. Carvalho ALM. Estudos sobre a posição sistemática, a biologia e a transmissão de tripanosomatídeos encontrados em *Zelus leucogrammus* (Perty, 1834) (Hemiptera, Reduviidae). Rev Pat Trop. 1973; 2:223-274.
21. De Lima AR, Fariás MN, Tortolero E, Navarro MC y Contreras VT. Purificación parcial y empleo de fracciones glicosídicas de *Trypanosoma cruzi* en el diagnóstico de la enfermedad de Chagas. Acta Cient Venez. 2001; 52(4):235-247.
22. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature. 1970; 227(5259):680-685.
23. De Moreno MR, Smith JF y Smith RV. Silver staining of proteins in polyacrilamide gels: increased sensitivity through a combined Coomassie blue-silver stain procedure. Anal Biochem. 1985; 151(2):466-470.
24. Moller HJ, Poulsen JH. Staining Glycoproteins/Proteoglycans on SDS PAGE. In: The Protein Protocols Handbook. 2nd Edition. Edited by: J.M. Walker. Humana Press Inc, Totowa, NJ 1996; 99:627-631.
25. De Lima AR, Arteaga R, Zorrilla G, Garboza R, Flores G, Araque W, et al. Glicoproteínas estadio específicas de *Trypanosoma cruzi*. Acta Cient Venez. 1996; 47(1):211.
26. Towbin H, Staehelin T y Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrilamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. Proc Natl Acad Sci USA 1979; 76(9):4350-4354.
27. Zorrilla G. *Trypanosoma cruzi*: Identificación peptídica y comparación inmunológica durante la morfogénesis. [Tesis de Maestría]. Universidad Simón Bolívar, Caracas Venezuela; 1999.
28. De Lima AR, Navarro MC, Domínguez MI, Graterol D, Arteaga R, Fernández A, et al. Antígenos Amastigota específicos son expresados durante la Epimastigogénesis de *Trypanosoma cruzi*. Acta Cient Venez. 2009; 60(1):Resúmenes del Congreso. Memorias del LIX Convención anual de AsoVAC. 2009; Nov 15-20; Mérida, Venezuela. <http://www.asovacmerida.org.ve/pdf/resumen.pdf>.

Salus

Revista de la Facultad de Ciencias de la Salud-Universidad de Carabobo

Volumen 17 - Suplemento - Año 2013

<p>Presidente del Consejo Superior José Corado</p> <p>Editora Marisol García de Yegüez</p> <p>Co-Editor Germán González</p> <p>Asesor Técnico Milagros Espinoza</p> <p>Miembros Amarilis Guerra Harold Guevara Yalitz Aular Belén Salinas Aldo Reigosa</p> <p>Salus Online Ricardo Montoreano</p>	<p>Asesores Mercedes Márquez - Cruz Manuel Aguilar - Wolfan Araque - María Jordán de Pelayo - Gladys Febres - Ricardo Montoreano - Julio González - Juan E. Ludert - Guillermo Wittembury - Michael Parkhouse César Pérez Maldonado - Esmeralda Vizzi</p> <p>Colaboradores Jeannette Silva (Dpto. Idiomas UC) Mayra Rebolledo (webmaster)</p> <p>Correctores de Redacción y Estilo Jeannette Silva Sioly Mora de Orta Luis Díaz</p> <p>Árbitros Miembros del personal docente y de investigación de la Universidad de Carabobo y otras instituciones de educación superior.</p>
---	---

<http://servicios.cid.uc.edu.ve/fcs/>
<http://salus-online.fcs.uc.edu.ve/>

Factores de riesgo, nivel de conocimiento y seroprevalencia de enfermedad de Chagas en el Municipio San Diego, Estado Carabobo, Venezuela.

Oriana Mundaray¹, Nicolás Palomo¹, Marvin Querales^{1,2}, Ana Rita De Lima^{1,3}, Víctor Contreras¹, Diana Graterol^{1,3}, Emilia Barrios^{4,5}

RESUMEN

En los últimos años se ha reportado en Venezuela una nueva realidad de la enfermedad de Chagas, con múltiples brotes de transmisión oral y vectorial, con participación de triatominos considerados antiguamente como silvestres que han colonizado zonas urbanas próximas a vegetaciones. El Municipio San Diego del Estado Carabobo se ha caracterizado por un gran crecimiento demográfico con expansión habitacional hacia zonas boscosas, y en donde se ha reportado la captura de triatominos domiciliarios y peridomiciliarios. En este estudio se evaluó los factores de riesgo y nivel de conocimiento de la enfermedad de Chagas, así como determinación de infección por *Trypanosoma cruzi* en el Sector A del mencionado Municipio. A través de pruebas serológicas, se obtuvo una seroprevalencia de 5,6% de un total de 90 individuos evaluados. Haciendo uso de un cuestionario, se encontró baja frecuencia de los factores de riesgo clásicos (condiciones de vivienda y presencia de chipos); no obstante, se obtuvo un porcentaje elevado de presencia de animales en el intra o peridomicilio (74%), así como de vegetación abundante próxima al hogar (82%). En cuanto al nivel de conocimiento, aproximadamente la mitad de los encuestados (46%) mostró un nivel intermedio, seguido de una considerable proporción de participantes con nociones bajas (34%). Los conocimientos más elevados correspondieron a la definición sobre la enfermedad de Chagas y sintomatología más frecuente (60%) e insecto vector (72%). Por otro lado, se obtuvo baja frecuencia en cuanto a los mecanismos de transmisión y reservorios del parásito. Los resultados sugieren la necesidad de ampliar los mecanismos de acción en la lucha contra la enfermedad de Chagas, promoviendo estrategias educativas que aumenten el conocimiento en la comunidad.

Palabras clave: *Trypanosoma cruzi*, enfermedad de Chagas, nivel de conocimiento, factores de riesgo.

¹ Laboratorio Protozoología. Instituto de Biología Molecular de Parásitos (BioMolP). Facultad de Ciencias de la Salud. Universidad de Carabobo. Valencia. Venezuela

² Departamento de Bioquímica. Escuela de Ciencias Biomédicas y Tecnológicas. Facultad de Ciencias de la Salud. Universidad de Carabobo. Valencia. Venezuela

³ Departamento de Morfopsiopatología. Escuela de Bioanálisis. Facultad de Ciencias de la Salud. Universidad de Carabobo. Valencia. Venezuela

⁴ Laboratorio de Helmintos. Instituto de Biología Molecular de Parásitos (BioMolP). Facultad de Ciencias de la Salud. Universidad de Carabobo. Valencia. Venezuela

⁵ Departamento de Investigación y Desarrollo Profesional. Escuela de Bioanálisis. Facultad de Ciencias de la Salud. Universidad de Carabobo. Valencia. Venezuela

Correspondencia: Marvin Querales.

E-mail: marvinquerales@hotmail.com

ABSTRACT

Risk factors, level of knowledge and seroprevalence of Chagas disease, in San Diego County, Carabobo State, Venezuela.

In recent years it has been Venezuela reported in Venezuela a new reality of Chagas disease, with multiple outbreaks of oral and vectorial transmission, involving formerly considered as wild triatomines that have colonized urban areas near vegetation. The San Diego County Carabobo state was characterized by a high population growth with residential expansion into forested areas, and where it has been reported domiciliary and peridomiciliary triatomine capture. In this study we evaluated the risk factors and level of knowledge of Chagas disease, as well to identify *Trypanosoma cruzi* infection in Sector A of the said municipality. Through serological tests yielded a seroprevalence of 5.6 % of a total of 90 individuals tested. Using a questionnaire, we found low frequency of traditional risk factors (housing conditions and presence of triatomines), however, we obtained a high percentage of animals in the presence of intra- or peri (74 %) and abundant vegetation close to home (82 %). Regarding the level of knowledge, about half of respondents (46 %) showed an intermediate level, followed by a considerable proportion of participants with low notions (34 %). Knowledge was highest in the definition of Chagas disease and most common symptom (60 %) and insect vector (72 %). On the other hand, it was obtained a low frequency transmission mechanisms and reservoirs of parasite. The results suggest the need to broaden the mechanisms of action in the fight against Chagas disease, promoting educational strategies that increase community awareness

Key words: *Trypanosoma cruzi*, Chagas disease, level of knowledge, risk factors.

INTRODUCCION

La enfermedad de Chagas es una patología causada por el parásito protozoario *Trypanosoma cruzi*, enfermedad endémica que afecta al continente americano. Este parásito se caracteriza por poseer un ciclo de vida heteroxeno, requiriendo dos hospedadores para completar su ciclo evolutivo. Los hospedadores invertebrados están representados por insectos hematófagos de la familia *Reduviidae* conocidos comúnmente como triatominos o chipos. Mientras que los hospedadores vertebrados están representados por una amplia variedad de mamíferos, incluyendo al hombre (1). Tradicionalmente en Venezuela el *Rhodnius prolixus* se consideraba como el principal vector en la transmisión de la enfermedad al hombre, participando en un ciclo doméstico; mientras que *Panstrongylus geniculatus* y *Triatoma maculata* eran considerados como vectores silvestres, con mantenimiento del ciclo evolutivo en mamíferos y con poca frecuencia al hombre (2).

Según datos de la PAHO en Venezuela se reporta para el año 2010 una población de 26.749.000 habitantes, de los cuales existen 310 mil infectados con *Trypanosoma cruzi* con una incidencia de 1400 casos anuales y una tasa de prevalencia de 1,159 casos por cada 1000 habitantes (3). Actualmente nuestro país posee una población expuesta de 4.944.000 habitantes en las zonas de riesgo, representadas por áreas próximas a piedemonte, así como focos irregulares en rangos más altos de las montañas. También hay una zona inestable, en la cual los paisajes están conformados por pastizales con árboles dispersos de hoja ancha perenne y las llanuras costeras (4).

Para el año 1960 se reportaba en el país una seroprevalencia de 45% de la enfermedad de Chagas en la población expuesta. Esto motivó a la creación a mediados de la década de los sesenta del Programa de Control de la Enfermedad de Chagas. Esta iniciativa se basó en el uso de insecticidas, sustitución del rancho por vivienda rural, aplicación de encuestas seroepidemiológicas y vigilancia entomológica tanto activa como pasiva (5). Esta iniciativa continuó con la incorporación de Venezuela a la iniciativa del Pacto Andino para erradicación del vector (6). Como consecuencia de estas acciones se redujo la seroprevalencia de la enfermedad de Chagas de 44,5% a 9,2%, así como una caída en la prevalencia a 3,2% en niños menores de 10 años. Conjuntamente con una reducción del índice de infestación de triatominos de 8,3% a 0,7% (7).

No obstante, el incremento de casos de malaria y la aparición del dengue hemorrágico conllevaron a una desviación de los recursos presupuestarios destinados a los Programas de Control anteriormente mencionados hacia estas enfermedades de curso agudo. Esto se manifiesta en una reemergencia de la enfermedad en diferentes regiones del país como Zulia y Cojedes (8), Barinas (9), Portuguesa (10), Trujillo y Mérida (11-13), Lara (10, 14-16), Aragua (17). Un aspecto que llama poderosamente la atención es la confirmación de transmisión activa de la enfermedad representada por aparición de casos positivos en niños menores de 2 años con una seroprevalencia de 0,12% en el estado Barinas (9). Así como una seroprevalencia de 0,57% en niños menores de 10 años en el Estado Lara (18).

Estudios realizados por varios grupos de investigadores han revelado una nueva realidad de la transmisión de la enfermedad de Chagas en nuestro país, como cambios en el comportamiento de los vectores en la transmisión de la enfermedad. De esta forma, se ha detectado no sólo la domiciliación de vectores silvestres en viviendas urbanas de zonas tradicionalmente no consideradas de riesgo (9,19), sino que además estaban infectados e implicados en la transmisión a humanos (20). Así como la participación de nuevos vectores en la propagación de la enfermedad como *Eratyrus mucronatus* (21). Más recientemente se ha reportado la aparición de brotes orales de la enfermedad de Chagas con participación de vectores considerados tradicionalmente como silvestres en varias localidades del país (22, 23).

Según datos del Laboratorio Regional de Apoyo Epidemiológico del Estado Carabobo se ha reportado la captura de triatominos en varios Municipios como Miranda, San Diego, Puerto Cabello, Libertador, Naguanagua y Carlos Arvelo. Estudios previos realizados en el Municipio San Diego del Estado Carabobo reportaron una prevalencia de 10,83% en la población estudiada, encontrándose que en su mayoría se encontraban distribuidos en los Sectores Norte A y Sur del mencionado Municipio (24).

Dada la actual situación epidemiológica de la enfermedad de Chagas en nuestro país, un aspecto importante es la educación sanitaria de la Población. En el presente trabajo se realizó un estudio del nivel de conocimiento sobre la Enfermedad de Chagas en residentes de comunidades de la zona norte del Municipio San Diego, como base para futuras estrategias de promoción de salud. Del mismo modo se determinó la seroprevalencia de la infección por *Trypanosoma cruzi*, aportando datos e información a la estadística nacional.

MATERIALES Y METODOS

El estudio se realizó en el Sector Norte A del Municipio San Diego del Estado Carabobo, ubicado con las siguientes coordenadas geográficas: Longitud 67°, 57', 10'' Oeste de Greenwich Latitud 10°, 14', 00'' Norte de Ecuador. Este sector comprende las siguientes comunidades: La Josefina I y II, Pueblo de San Diego, Las Mercedes, Sabana del Medio, La Cumaca, Los Tamarindos, San Francisco de Cupira, La Lopera, El Polvero-Higuerote, El Otro Lado, Las Morochas (I, II, III y IV), Mini Granjas San Diego, Urbanización Valle Fresco, La Ponderosa, Las Trianas, Las Trinitarias, Valles de San Diego y Villa Jardín.

La población estuvo representada por los habitantes del sector Norte A de las comunidades La Josefina I y II, Pueblo de San Diego, Las Mercedes, Sabana del Medio, La Cumaca, Los Tamarindos, San Francisco de Cupira, La Lopera, El Polvero-Higuerote, El Otro Lado y Las Morochas para un total de 8222 habitantes según datos del Instituto Nacional de Estadística para el año 2004. La muestra estuvo representada por 90 individuos, quienes acudieron de forma voluntaria a las jornadas de despistaje de infección por *Trypanosoma cruzi* realizadas en un módulo de atención primaria adscritos a la alcaldía del municipio. La convocatoria a las jornadas se efectuó mediante volanteo y visitas domiciliarias a las comunidades.

Esta investigación fue de tipo descriptiva, no experimental, de campo y de corte transversal, realizado entre los meses de febrero y marzo de 2012. Previo al muestreo, se aplicó un consentimiento informado por escrito a cada paciente que asistió a las diferentes convocatorias, según lo contemplado en los requisitos bioéticos de la Convención de Helsinki (25).

Se utilizó como instrumento un cuestionario dividido en tres partes. En la primera parte se obtuvieron datos personales, socioeconómicos y demográficos, antecedentes

personales de enfermedad de Chagas en primer grado de consanguinidad.

El estrato socioeconómico (ESE) se calculó a través del método de Graffar modificado por Méndez-Castellano (26). En la segunda parte se evaluaron mediante seis ítems factores de riesgo asociados con la infección por *Trypanosoma cruzi*: presencia de triatomíneos (adultos, ninfas, huevos o exhubias), animales en el intra o peridomicilio, vegetación próxima (palmeras o morichales cercanos), y condiciones de infraestructura de la vivienda que favorecen la domiciliación del vector (piso de tierra, techo de palma y paredes de bahareque).

La tercera parte de la encuesta de preguntas estructuradas, diseñada "ad hoc", permitió conocer el Nivel Óptimo de Conocimiento (NOC) de los participantes en cuanto a los factores de riesgo relacionados con la enfermedad de Chagas e infección por *Trypanosoma cruzi*. La misma fue sometida a juicio de expertos. Fueron diez las categorías a evaluar para establecer el NOC: cuatro preguntas relacionadas con el vector (reconocimiento, tipo de hábitat, fuente de alimentación, refugios y reservorios) y seis ítems con la infección por *Trypanosoma cruzi* y la enfermedad de Chagas (definición, producción de fiebre y miocardiopatía, transmisión placentaria y oral por los alimentos, riesgo de las transfusiones sanguíneas).

Para definir el nivel de conocimiento de cada participante se calculó la distribución percentilar del número de categorías correctamente identificadas en el grupo total de individuos estudiados, considerándose que un participante tendrá un NOC bajo si identificó correctamente hasta 3 (Percentil 25) de las categorías encuestadas; intermedio si identificó entre 4 y ocho categorías; y alto si logró identificar nueve (percentil 75) o más categorías.

Toma de muestra sanguínea y establecimiento de la infección por *Trypanosoma cruzi*. Las muestras de sangre se recolectaron mediante venopunción utilizando tubos sin anticoagulante para la obtención de suero. Se procedió a la búsqueda de anticuerpos específicos contra *Trypanosoma cruzi* mediante la ejecución de tres pruebas serológicas: Hemaglutinación Pasiva (HP), inmunoensayo enzimático (ELISA) y Reacción Indirecta de Anticuerpos fluorescentes (RIAF). Se consideró como positivo la infección por *Trypanosoma cruzi* a la positividad de la reacción en dos de las tres técnicas efectuadas.

Reacción de hemaglutinación. Se utilizó el kit comercial Chagatest HAI (Laboratorios Wiener) previa precipitación de anticuerpos IgM mediante la utilización de 2-mercaptoetanol. Como control negativo se utilizó suero de individuos aparentemente sanos procedentes de zona no endémicas que resultaron negativos en ensayos anteriores a la infección por *T. cruzi* mediante las técnicas de ELISA, inmunoblotting y RIAF. Se consideró como positivo un título igual o mayor a una dilución de 1/16.

Ensayo inmunoenzimático (ELISA). Se siguió el protocolo desarrollado para proteínas (27). Se utilizó antígeno de Maeckelt (28) obtenido a partir de epimastigotas de *T. cruzi*. Se sensibilizaron los pozos de la placa con 0,5 µg de antígeno en solución carbonato-bicarbonato durante 1 hora a 37° C. Luego de tres lavados con PBS + 0,1% Tween-20, se procedió al bloqueo con leche descremada al 7,5% en Solución carbonato-bicarbonato y posterior lavado (3X) de los pozos con PBS + 0,1% Tween 20.

Para la titulación de anticuerpos, se hizo diluciones seriadas dobles del suero en PBS + 0,05% Tween 20 y se incubó durante 1 hora a 37° C. Luego de tres lavados con PBS + 0,1% Tween-20, se procedió a la incubación con la correspondiente anti inmunoglobulina (anti-IgG o anti-IgM humana acoplada a peroxidasa, Sigma) en PBS + 0,05% Tween 20 (1 hora, 37°C).

Luego de tres lavados con PBS-Tween 20, se procedió al revelado utilizando como substrato ortofeniléndiamina e incubación durante 12 minutos a temperatura ambiente.

Se detuvo la reacción con 0,1 M azida de sodio y se procedió a la lectura de las respectivas absorbancias utilizando una longitud de onda de 490 nm.

Reacción Indirecta de Anticuerpos Fluorescentes (RIAF).

Para el ensayo se utilizó epimastigotas de *Trypanosoma cruzi* procedentes de cultivo en medio LITB. Los parásitos se lavaron 3 veces en PBS (3 minutos, 14000 xg, 4°C) en microcentrífuga Eppendorf y fijados con PBS suplementado con 3,7% formaldehído durante 30 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente fueron lavados 3 veces en PBS bajo las mismas condiciones y ajustados a un número de 2×10^7 parásitos/mL.

Estos epimastigotas se colocaron sobre láminas portaobjeto recubiertas con poli-L-lisina (10 µg/ml) y se permitió adhesión por 30 minutos a temperatura ambiente.

Los grupos aldehídos libres se bloquearon con 50mM NH₄Cl en PBS durante 30 minutos a temperatura ambiente y se lavó la lámina 3 veces en PBS. Los parásitos se permeabilizaron con 0,1% Tritón X-100 en PBS durante 10 minutos a temperatura ambiente y se lavaron una vez con PBS. Para prevenir el enlace inespecífico de anticuerpos, la lámina se incubó con PBS + 1% seroalbúmina bovina (BSA) durante 30 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se incubó con diluciones dobles seriadas del suero del paciente durante una hora en cámara húmeda a 37°C.

Luego de tres lavados en PBS, se adicionó el anticuerpo conjugado anti-IgG humana acoplado a isotiocianato de fluoresceína (1/100) durante 1 hora a 37°C. La dilución de los anticuerpos primarios y conjugados se realizó en PBS + 1% BSA. Luego de cuatro lavados con PBS, se cubrieron los parásitos con una laminilla de 22 x 40 mm sobre glicerol:PBS (9:1) y se sellaron los bordes con parafina líquida. Las

láminas se visualizaron con un aumento de 1000X en un microscopio de epifluorescencia (Nikkon, Eclipse 400) (29).

Análisis de los datos. Para el análisis de los datos se utilizó el programa estadístico SPSS versión 15 para Windows 2007. Variables cuantitativas tales como la edad, fueron expresadas como media aritmética y desviación estándar, mientras que las cualitativas en forma de frecuencias y porcentajes. Los resultados referentes al nivel de conocimiento y factores de riesgo se expresaron en gráficos. La asociación entre variables se presentó mediante tablas de contingencia utilizando la prueba de chi cuadrado (χ^2). Se consideró como significativo un valor de $p < 0,05$.

RESULTADOS

Se evaluaron 90 pacientes con edades comprendidas entre 18 y 87 años ($44,4 \pm 16,0$ años) de los cuales 26 (28,9%) pertenecían al género masculino y 64 (71,1%) al femenino. Los mismos tenían un tiempo de residencia en el municipio San Diego de $28,0 \pm 19,0$ años. Las características del

grupo en estudio se muestran en la Tabla 1. En cuanto al grado de instrucción, se observó que más de la mitad de la muestra presentaba secundaria completa, técnico medio o técnico superior universitario; un poco más de la cuarta parte presentaban niveles de primaria y/o secundaria incompleta. Un 15,6% estaba cursando o había culminado carreras largas a nivel universitario y se detectó muy bajo porcentaje de analfabetismo. Por otro lado, más de las tres cuartas partes de los participantes en el estudio estuvo ubicado entre los estratos socioeconómicos intermedios (III y IV), sin diferencias estadísticas según género.

Con respecto a los antecedentes personales de enfermedad de Chagas, se observó que en ambos géneros se evidenció un alto porcentaje de hipertensión arterial (78,9%), seguido por la presencia de enfermedad cardíaca isquémica, ésta mucho más significativa en la población femenina.

Se reportó muy bajo porcentaje de dengue, así como poca incidencia de manifestaciones propias de la fase aguda de la enfermedad de Chagas, siendo los más representativos la cefalea, mialgia y taquicardia.

Tabla 1. Características de la muestra estudiada según género

CARACTERÍSTICAS	Masculino (n=26) (%)	Femenino (n=64) (%)	Grupo Total (n=90) (%)
Grado de Instrucción			
Analfabeto	7,7	1,6	3,3
Sólo sabe leer y escribir, cursó sólo primaria o hasta noveno año de secundaria sin aprobarlo.	19,2	10,9	13,3
Secundaria incompleta (mínimo noveno año de secundaria aprobado)	7,7	18,8	15,6
Secundaria completa, Técnico medio o Técnico Superior Universitario	53,8	51,6	52,2
Enseñanza universitaria	11,5	17,2	15,6
Estrato Socioeconómico			
Estrato I	3,8	0,0	1,1
Estrato II	23,1	17,2	18,9
Estrato III	38,5	54,7	50,0
Estrato IV	34,6	26,6	28,9
Estrato V	0,0	1,6	1,1
Antecedentes personales de enfermedad de Chagas			
Hipertensión arterial autoreportado	80,8	78,1	78,9
Antecedente personal de ECI autoreportado	11,5	37,5	30,0
Dengue autoreportado (%)	7,7	6,3	6,7
Sintomatología reciente (%)			
Fiebre	3,8	12,5	10,0
Cefalea	23,1	35,9	32,2
Mialgia	19,2	17,2	17,8
Hipertensión Arterial	38,5	25,0	28,9
Taquicardia	11,5	17,2	15,6
Edema	3,8	4,7	4,4

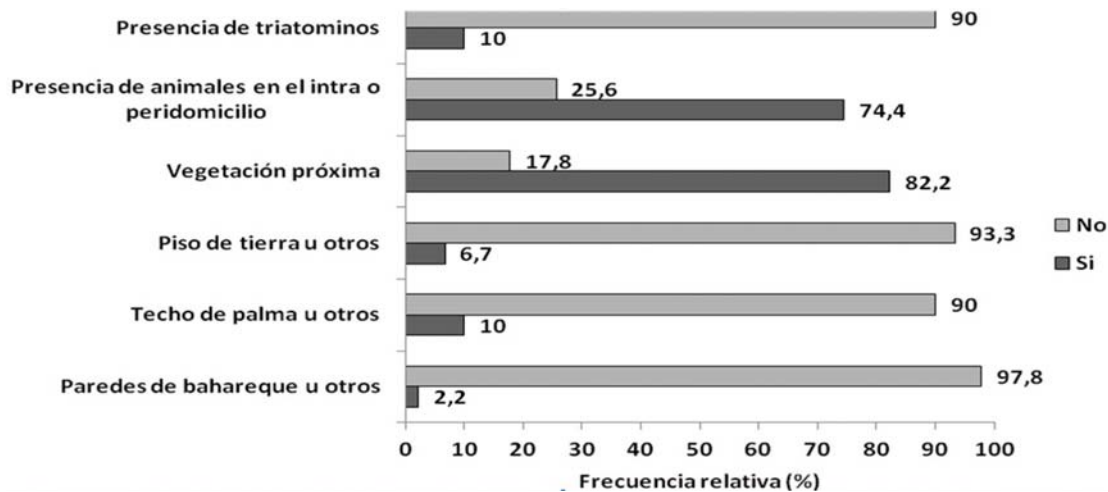


Figura 1. Factores de riesgo asociados a la infección por *Trypanosoma cruzi*.

En la figura 1 se muestran los resultados obtenidos durante la evaluación de los factores de riesgo para la transmisión de la enfermedad de Chagas.

Se detectó baja presencia de triatomíneos en el interior del domicilio, pero sí un importante número de encuestados manifestaron poseer animales domésticos como perros y gatos (intradomicilarios), así como otros de localización peridomiciliar como caballos y gallinas.

Motivado a las características de la zona geográfica estudiada, un 82% de los encuestados manifestaron presentar vegetación abundante próxima a la vivienda, encontrándose vegetación vinculada con el hábitat de triatomíneos peridomésticos y silvestres como palmeras y morichales. No obstante, las condiciones de infraestructura de las viviendas representaron muy bajo factor de riesgo para la domiciliación para el vector, reportándose apenas un 10% de techos de palma y un 3% de paredes de bahareque.

La evaluación de los ítems concernientes al nivel de conocimiento sobre la infección por *Trypanosoma cruzi*

y enfermedad de Chagas se muestra en la tabla 2. Aproximadamente más de la mitad de los participantes afirmaron conocer que es la enfermedad de Chagas, así como su sintomatología más frecuente (fiebre) y consecuencias a largo plazo (miocardiopatía). Además, un porcentaje bastante elevado (72%), conoce cuál es el insecto vector. No obstante se obtuvo baja frecuencia en cuanto al conocimiento referente a los mecanismos de transmisión y reservorios del parásito.

La Figura 2 muestra la distribución de los individuos (%) según el número de respuestas afirmativas en la encuesta referentes al nivel de conocimiento sobre la enfermedad de Chagas e infección por *Trypanosoma cruzi*. Se observó que alrededor de la mitad de los participantes mostraron un nivel intermedio de conocimiento, seguido de una considerable proporción de participantes con bajas nociones (34%).

Al aplicar la prueba de Chi cuadrado, no se obtuvo asociación estadísticamente significativa entre el nivel de conocimiento en los participantes y su respectivo estrato socioeconómico (Chi-cuadrado=2,38; p=0,6669).

Tabla 2. Evaluación del nivel de conocimiento sobre la infección por *Trypanosoma cruzi* y Enfermedad de Chagas

Pregunta	Respuestas afirmativas	
	Frecuencia absoluta	Frecuencia relativa
¿Sabe que es la Enfermedad de Chagas?	57	63,3
¿Conoce cuál es el reservorio del parásito?	24	26,7
¿Conoce el tipo de insecto que transmite la enfermedad?	65	72,2
¿Conoce el hábitat del insecto vector?	45	50,0
¿Conoce la fuente de alimentación del insecto vector?	40	44,4
¿Sabe que la Enfermedad de Chagas produce fiebre?	52	57,8
¿Sabe que la Enfermedad de Chagas produce miocardiopatía?	56	62,2
¿Sabe si la enfermedad de Chagas se transmite a través de la placenta?	25	27,8
¿Sabe si la enfermedad de Chagas se transmite a través de los alimentos?	31	34,4
¿Sabe si se tiene riesgo de contraer infectarse con <i>T. cruzi</i> por una transfusión sanguínea?	31	34,4

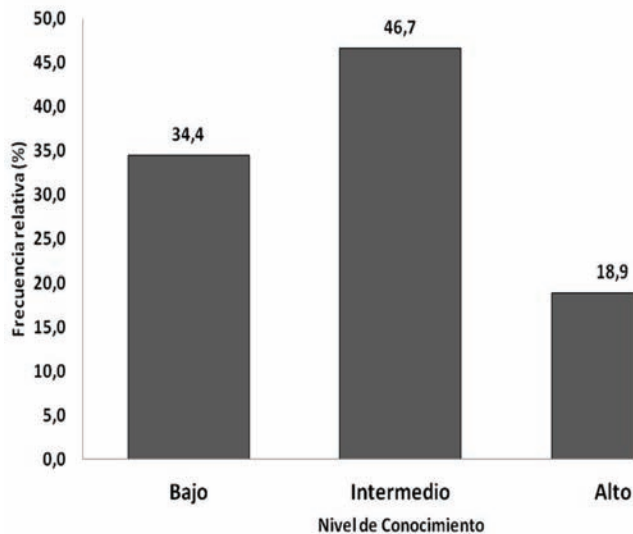


Figura 2. Distribución de los individuos estudiados (%) según nivel de conocimiento sobre la enfermedad de Chagas e infección por *Trypanosoma cruzi*. Nivel de conocimiento Bajo= hasta 3 (Percentil 25) factores de riesgo identificados; Intermedio= entre 4 y 8 factores identificados; Alto= 9 (percentil 75) o más factores identificados. n= 90.

En la Tabla 3 se muestran los resultados de las pruebas diagnósticas de la enfermedad de Chagas que se practicaron a los pacientes incluidos en el presente estudio. Al evaluar las distintas técnicas empleadas, se pudo encontrar que cinco de los 90 pacientes estudiados (5,6% de la muestra) presentó anticuerpos IgG contra *Trypanosoma cruzi*, de los cuales uno pertenecía al estrato socioeconómico II, dos de ellos pertenecían al estrato III y dos al estrato IV (resultados no mostrados). No se detectó presencia de anticuerpos IgM en ninguno de los pacientes evaluados por la técnica de ELISA.

Tabla 3. Resultados de las pruebas diagnósticas de la enfermedad de Chagas.

Resultados	Método Serológico				Total(%) [*]
	ELISA		RIAF	Aglutinación	
	IgM	IgG			
Positivos	0	13	3	6	5(5,6)
Negativos	90	77	87	84	85(94,4)
Total	90	90	90	90	90(100%)

^{*}Se indica cuyo resultado haya sido consistente en por lo menos dos de las pruebas diagnósticas.

DISCUSIÓN

En el presente trabajo se pretendió realizar un estudio de la infección por *Trypanosoma cruzi* y la enfermedad de Chagas que fuese más allá del diagnóstico serológico, para lo cual se hizo una evaluación de los posibles factores de riesgo y del nivel de conocimiento de un sector del Municipio San Diego donde se había reportado previamente la parición de casos positivos de infección chagásica (24).

De un sondeo de seis factores de riesgo tradicionales para la transmisión de la infección con *Trypanosoma cruzi*, sólo dos de ellos se encontraron en un porcentaje representativo de la muestra estudiada. Esto concuerda con resultados previos realizados en zonas rurales de los estados Anzoátegui, Guárico y Cojedes de Venezuela, donde se evidenció que pocas viviendas poseían cinco o más elementos de riesgo para la adquisición de la parasitosis (30).

Es necesario recordar que la tripanosomiasis americana como parasitosis nidal, está condicionada por factores como clima, relieve, suelo, flora y fauna y puede ser revelada por la presencia de factores enzoóticos que actuarían como bioindicadores potenciales de la parasitosis, mucho antes de que el hombre entre en la cadena de transmisión (31). En base a esto, destaca en el presente estudio, la elevada frecuencia de la presencia de animales en el intra y peridomicilio así como de vegetación abundante cercana. Coincidiendo con resultados anteriores donde se registra una elevada prevalencia de reservorios en las viviendas (perros, caprinos, gallinas y pájaros) de forma permanente o temporal (16). Trabajos previos han indicado que la presencia de perros y gallinas en el área domiciliar se asocia con la seropositividad en humanos (32). Los perros representan reservorios para la infección por *T. cruzi*, y su presencia en el domicilio está fuertemente correlacionada con un mayor número de triatomos infectados y una mayor prevalencia de enfermedad de Chagas en niños. Las gallinas por su parte son fuentes de alimento para los triatomos y su presencia en las áreas domiciliarias impacta la ecología doméstica de la enfermedad de Chagas, ya que, incrementan la infestación del domicilio, conllevando a un incremento en el contacto del vector con los reservorios domésticos, y aumentando de esta manera el número de triatomos infectados (33). La asociación entre seropositividad y la presencia de pájaros y armadillos podría estar relacionada con viviendas localizadas en ambientes selváticos. Los pájaros como fuente de alimento y los armadillos como reservorio, son animales que logran mantener los ciclos peridoméstico y selvático de la enfermedad de Chagas (34). Esto es muy importante, sobre todo, porque existen individuos que reportaron la presencia de chipos en sus viviendas y que conlleva a tomar medidas preventivas para evitar la infección parasitaria.

La seropositividad de los individuos analizados en este estudio fue de 5,6%, inferior a la reportada en un estudio similar realizado en individuos procedentes de varios sectores del mismo Municipio (24). Esto puede explicarse en base a que en el mencionado estudio los autores no realizaron una convocatoria abierta a la comunidad, por el contrario, evaluaron casos particulares referidos a la consulta de Cardiología de un Ambulatorio local por presentar sintomatología compatible con la enfermedad de Chagas. Sin embargo, es necesario destacar que investigaciones previas llevadas a cabo en el estado Carabobo, han reportado una prevalencia de infección cercana al 12% (35), mientras que otras regiones de Venezuela, como la

parroquia San Miguel en el estado Lara (16), el municipio Costa de oro en el estado Aragua (17) y la zona rural de Miraflores en el estado Monagas (36) refieren que la prevalencia no supera el 10%. Si bien la seroprevalencia es baja, se pudiera pensar en que hay una reemergencia leve de la enfermedad de Chagas, afirmación que resulta tomando en cuenta que la mayoría de los pacientes positivos no superaban los 45 años; estimulando así desde los ejes gubernamentales la vigilancia epidemiológica, la promoción de salud y la prevención.

Estas acciones de la lucha contra la enfermedad de Chagas debe abarcar más acciones que el simple ataque químico de los vectores sin tener en cuenta que existen factores de riesgo, como la falta de higiene, el desorden y la presencia de animales dentro de la vivienda, que parecen ser responsables de la persistencia de focos de triatomíneos en áreas rurales (37). El factor educativo es crucial para una correcta ejecución de las medidas preventivas. En el presente estudio, se observó que casi la mitad de los participantes tenía un nivel de conocimiento intermedio y que un tercio de los mismos tenía un conocimiento bajo. Lo mismo reportaron Herrera y colaboradores (31), observando un conocimiento de bajo a medio de la parasitosis, siendo el conocimiento de los vectores, su hábitat y su condición de hematofagia los más relevantes; seguido del reconocimiento de la enfermedad, y al igual que el actual estudio, elementos como el reconocimiento de vías alternas de transmisión como la congénita y transfusional y oral fueron menos conocidos. Sobre todo tomando en cuenta el auge de la transmisión oral en Venezuela, donde se han reportado cinco brotes en diferentes zonas del país (Referencia) con participación de vectores que anteriormente eran considerados como silvestres. De la misma manera, en Argentina se reportó una elevada frecuencia de los conocimientos básicos sobre la enfermedad de Chagas, pero pocos aciertos en relación a su mecanismo de transmisión congénita (38).

El número elevado de individuos con un conocimiento intermedio pudiera deberse a que la gran mayoría de los encuestados presenta un nivel de instrucción superior o igual a secundaria completa, los cuales tendrían mayor acceso a la información básica y epidemiológica de la enfermedad. Sin embargo, se hace necesario profundizar en la comprensión de los mecanismos de transmisión alternos, cuyo desconocimiento es independiente del nivel de instrucción y del estrato socioeconómico.

Un mejor conocimiento del tema supondría un importante avance en la lucha contra la enfermedad de Chagas, conduciendo a los habitantes de áreas endémicas a una mejor comprensión de su realidad y a la adquisición de hábitos que les permitan ser los protagonistas de su propio bienestar (31). Cabe destacar que este tipo de acciones están enmarcadas en los retos futuros del Programa de Control de la Enfermedad de Chagas en Venezuela en donde destaca la imperiosa necesidad de reorientar sobre bases científicas las acciones de monitoreo, prevención y control; así como incrementar

los esfuerzos para incorporar la participación comunitaria a la vigilancia de la enfermedad, aspectos no abordados en el pasado y que deben ser además considerados como una prioridad urgente dentro de una política integral del mencionado programa en Venezuela (4).

El presente estudio tiene limitantes relacionadas con el grupo etario muestreado, en el cual no se incluyeron infantes, sugiriendo la realización de nuevas investigaciones que abarquen esta población en el Municipio San Diego. Sin embargo, este trabajo tiene como aporte, además de contribuir a las estadísticas seroepidemiológicas en el Estado Carabobo, que es uno de los pocos estudios sobre conocimiento y riesgo para la enfermedad de Chagas en áreas endémicas de Venezuela. Además, de incentivar a la expansión del espectro de medidas preventivas llevadas a cabo en la actualidad en la lucha contra la enfermedad de Chagas.

REFERENCIAS

1. Tyler KM, Engman DM. (2001). The life cycle of *Trypanosoma cruzi* revisited. *Int J Parasitol* 2001; 31:472-481.
2. Briceño-León, R. Rural housing for control of Chagas disease in Venezuela. *Parasitol Today* 1987; 3(12):384-387.
3. Berrizbeitia, M. Epidemiología de la enfermedad de Chagas en Venezuela. 2012. Disponible en: http://www.svh-web.org.ve/index.php?option=com_docman&task=doc_download&gid=293&Itemid=18 (Fecha de la consulta: 6 de septiembre de 2013)
4. Feliciangeli M. Control de la enfermedad de en Venezuela. Logros pasados y retos presentes. *Interciencia* 2009; 34(6): 393-399.
5. Guerrero L, Domínguez-Quesada M, García-Martín G, Borges L. Estado actual de la campaña contra la enfermedad de Chagas en Venezuela. *Arch Venez Med Trop Parasitol* 1965; 5:219-265.
6. World Health Organization. Reporte sobre la enfermedad de Chagas. Buenos aires: Programa Especial de Investigaciones y Enseñanzas sobre Enfermedades Tropicales (TDR) UNICEF/PNUD/BancoMundial/OMS. 2007 Disponible en http://www.who.int/tdroid/publications/publications/pdf/swg_chagas.pdf. (Fecha de la consulta: 30 Marzo 2013).
7. Aché A, Matos AJ. Interrupting Chagas disease transmission in Venezuela. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 2001; 43:37-43
8. Hubsch RM, Chiechie N, Comach G, Aldao RR, Gusmao RD. The Dot immunoenzymatic assay on nitrocellulose (Dot-ELISA) in the diagnosis of Chagas disease. II. Seroepidemiologic study in 4 rural communities of Venezuela. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1989; 84(3):401-408.
9. Feliciangeli MD, Sánchez-Martín MJ, Suárez B, Marrero R, Torrellas A, Bravo A, Medina M, Martínez C y col. Risks factors for *Trypanosoma cruzi* human infection in Barinas state, Venezuela. *Am J Trop Med Hyg* 2007; 76:915-921.

10. Bravo I, Parra, F, Pérez C, Rodríguez-Bonfante C, Useche F, Bonfante-Cabarcas R. Prevalence of *Trypanosoma cruzi* antibodies and inflammatory markers in uncompensated herath failure. *Rev Soc Bras Med Trop* 2011; 44(6):691-696.
11. Añez N, Carrasco H, Parada H, Crisante G, Rojas A, González N, Ramírez J, Guevara P, Rivero C, Borges R, Scorza J. Acute Chagas disease in western Venezuela: A clinical, seroparasitologic and epidemiologic study. *Am J Trop Med Hyg* 1999; 60:215-222.
12. Añez N, Crisante G, Rojas A, Carrasco H, Parada H, Yépez Y, Borges R, Guevara P, Ramírez JL. Detection and significance of inapparent infection in Chagas disease in western Venezuela. *Am J Trop Med Hyg* 2001; 65: 227-232.
13. Añez N, Crisante G, Rojas A, Díaz N, Añez-Rojas N, Carrasco H, Parada H, Aguilera M, Moreno G, Galíndez-Girón I, Sandoval R, Sandoval I, Vásquez L, Nava-Rulo O, Guerra F, Uzcátegui G, Yépez J, Rodríguez C, Bonfante-Cabarcas R. La cara oculta de la enfermedad de Chagas en Venezuela. *Bol Mal Salud Amb* 2003, 43:227-232.
14. Feliciangeli M, Carrasco H, Patterson J, Suárez B, Martínez C, Medina M. Mixed domestic infestation by *Rhodnius prolixus* and *Panstrongylus geniculatus* Latreille, 1811, vector incrimination, and seroprevalence for *Trypanosoma cruzi* among inhabitants in El Guamito, Lara State, Venezuela. *Am J Trop Med Hyg* 2004, 71: 501-505.
15. Rojas M, Várquez P, Villarreal M, Velandia C, Vergara L, Morán-Borges Y, Ontiveros, J, Calderón M, Chiurillo- Siervo M, Rodríguez- Bonfante C, Aldana E, Concepción J, Bonfante-Cabarcas R. Estudio seroepidemiológico y entomológico sobre la enfermedad de Chagas en un área infestada por *Triatoma maculata* (Erichson 1848) en el centro- occidental de Venezuela. *Cad Saúde Pública* 2008, 24: 2323- 2333.
16. Bonfante-Cabarcas R, Rodríguez-Bonfante C, Oviol V, García D, Mogollón A, Aldana E, et al. Seroprevalencia de la infección por *Trypanosoma cruzi* y factores asociados en un área endémica de Venezuela. *Cad Saúde Pública* 2011; 27(10):1917-1929.
17. Serrano O, Mendoza F, Suárez B, Soto A. Seroepidemiología de la enfermedad de Chagas en dos localidades del Municipio Costa de oro, Estado Aragua, Venezuela. *Biomédica* 2008; 28(1):108-115.
18. Rodríguez-Bonfante C, Amaro A, García M, Wohlert LEM, Guillen P, García RA, Álvarez N, Díaz MA, Cárdenas E, Castillo S, Bonfante-Garrido R, Bonfante-Cabarcas R. Epidemiología de la enfermedad de Chagas en el municipio Andrés Eloy Blanco, Lara, Venezuela: infestación triatomínica y seroprevalencia en humanos. *Cad Saúde Publica* 2007, 23: 1133- 1140.
19. Reyes-Lugo M, Rodríguez-Acosta A. A domiciliation of the sylvatic Chagas disease vector *Panstrongylus geniculatus* Latreille, 1811 (*Triatominae: Reduviidae*) in Venezuela. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2000; 94:508.
20. Carrasco HJ, Torrellas A, García C, Segovia M, Feliciangeli MD. Risk of *Trypanosoma cruzi* (*Kinetoplastida: Trypanosomatidae*) transmission by *Panstrongylus geniculatus* (*Hemiptera: Reduviidae*) in Caracas (Metropolitan District) and neighboring states, Venezuela. *Int J Parasitol* 2005; 35:1379-1384.
21. Soto A, Barazarte H, Molina D. Primer registro de *Eratyrus mucronatus* Stål, 1959 (*Hemiptera: Reduviidae*) en el ambiente domiciliario en Venezuela. *Entomotropica* 2001; 16(3): 215-217.
22. Alarcón de Noya B, Díaz-Bello Z, Colmenares C, Ruiz-Guevara R, Mauriello L, Zavala-Jaspe R, Suarez J A, Abate T, Naranjo L, Paiva M, Rivas L, Castro J, Márques J, Mendoza I, Acquatella H, Torres J, Noya O. Large urban outbreak of orally acquired acute Chagas disease at a school in Caracas, Venezuela. *J Infect Dis* 2010; 201(9):1308-1315.
23. Muñoz-Calderón A, Díaz-Bello Z, Valladares B, Noya O, López MC, Alarcón de Noya B, Thomas MC. Oral transmission of Chagas disease: typing of *Trypanosoma cruzi* from five outbreaks occurred in Venezuela shows multiclonal and common infections in patients, vectors and reservoirs. *Infect Genet Evol* 2013; 17:113-22.
24. De Lima A, Castro V, Querales M, Leal U, Contreras V, Graterol D, De Lima A. Seroprevalencia de la infección por *Trypanosoma cruzi* en el Municipio San Diego. Estado Carabobo. Venezuela. *Avances en Ciencias de la Salud* 2012; 1(2):40-45.
25. Consejo de Organizaciones Internacionales de las Ciencias Médicas (CIOMS). 2002. Disp. en: http://www.cioms.ch/frame_spanish_text.htm.
26. Méndez-Castellanos H. Sociedad y Estratificación. Método Graffar-Méndez Castellano. Caracas: Fundacredesa. 1994.
27. Engwall E, Perlmann P. Enzyme- linked immunosorbent assay (ELISA) quantitative assay for immunoglobulin G. *Inmunochem* 1971; 8:871- 873.
28. Maekelt, G. A. Fracciones antigénicas del *Schizotrypanum cruzi* como fijador del complemento. *Arch Venez Med Trop Parasitol Med* 1962, 4: 213-262.
29. Souto-Padrón T, Cunha NI, De Souza W. Acetylated alpha-tubulin in *Trypanosoma cruzi*: immunocytochemical localization. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1993; 88:517-528.
30. Herrera L, Aguilar C, Brito A, Morocoima A. Conocimiento y riesgo de infección para la Tripanosomiasis Americana o enfermedad de Chagas en áreas rurales de Venezuela. *Salus* 2007; 11: 27-31.
31. Herrera L. Una revisión sobre reservorios de *Trypanosoma* (*Schizotrypanum*) *cruzi* (Chagas, 1909), agente etiológico de la Enfermedad de Chagas. *Bol Mal Salud Amb* 2010; 50(1): 3-15.
32. Manrique D, Manrique F, Lorca M, Ospina J. Prevalencia de anticuerpos para *Trypanosoma cruzi* en caninos de dos municipios endémicos de Boyacá. *Rev MVZ Córdoba*, 2012; 17(1):2916-2923.
33. Cortés L, Suárez H. Triatominos (*Reduviidae: Triatominae*) en un foco de enfermedad de Chagas en Talaigua Nuevo (Bolívar, Colombia). *Biomédica* 2005; 25:568-574.
34. Roque AL, Xavier SC, da Rocha MG, Duarte AC, D'Andrea PS, Jansen AM. *Trypanosoma cruzi* transmission cycle among wild and domestic mammals in three areas of orally transmitted Chagas disease outbreaks. *Am J Trop Med Hyg* 2008; 79:742-749.

35. Cannova D, Arvelo L, Simons M. Seroepidemiología de Tripanosomiasis Americana, sector Las Cuevas. Estado Carabobo. *Salus* 2003; 7:28-33.
36. Berrizbeitia M, Aguilera G, Ward B, Rodríguez J, Jorquera A, Ndao M. Seroprevalencia de la infección por *Trypanosoma cruzi* en la población rural de Miraflores, estado Monagas. Estabilidad y diferencia de reactividad de epimastigotes fijados. *Rev Soc Ven Microbiol* 2010; 30:55-56.
37. Sanmartino M, Crocco L. Conocimientos sobre la enfermedad de Chagas y factores de riesgo en comunidades epidemiológicamente diferentes de Argentina. *Rev Panam Salud Pública* 2000; 7(3): 173-178.
38. Genero S, Nasir J, Cayre A, Pascual M, Gorostegui F, Chaparro R, et al. Conocimientos y actitudes en relación con la enfermedad de Chagas en la población de Avia Terai, provincia del Chaco. *Rev Argent Salud Pública* 2011; 2(9):6-10.



**BIBLIOTEC
CENTRAL** DE LA UNIVERSIDAD
DE CARABOBO
FUNDACION CENTRO DE INFORMACION Y DOCUMENTACION



Visión

Ser la Biblioteca Central de la Universidad de Carabobo, reconocida por la eficiencia de sus servicios y por el valor de sus aportes a la producción científica y a la calidad de la enseñanza, contribuyendo a la formación de conciencia nacional, apoyada en sus trabajadores, en la alta tecnología e intercambiando información con los centros más avanzados del mundo.

Misión

Coordinar y sostener la Red de Información Académica de la Universidad de Carabobo garantizando su eficacia, eficiencia y coherencia interna. Crear y ejecutar los procedimientos para la oportuna dotación material de las bibliotecas. Promover la formación profesional de los trabajadores del área de la información. Elaborar base de datos y otros productos informacionales con alto valor agregado. Vincular a la Universidad a nivel nacional e internacional mediante el intercambio de información.

Objetivos

Planificar, crear, consolidar y administrar los servicios de información que mejor sirvan al desarrollo de la ciencia, la investigación, la tecnología, la educación, la extensión y la gestión.

Valores

- Trabajo en Equipo
- Ética
- Creatividad
- Vocación de Servicio
- Excelencia

Ofrece Formación en el área de Ciencias de la Información y Tecnología, con los siguientes programas:

Escuela de Información: Diplomado Analista Documentalista, Asistente de Biblioteca, Programa de Actualización de Archivista, Construcción de Indicadores de Gestión de Centros de información y Documentación, Estrategias Gerenciales para no Gerentes.

Escuela de Tecnología: Redes de Área Local y WiMax bajo el programa CISCO, Profesional Certificado Linux, PHP-MySQL, Java, Microsoft System Engineer, Microsoft Professional Developer.

URL: <http://www.cid.uc.edu.ve/>

E-mail: fundacid@uc.edu.ve

Ubicación: Urb. Prebo, Av. Andrés Eloy Blanco c/c calle 137-20. Edificio Centro Escorpio, pisos 2 y 3. Valencia, estado Carabobo, Venezuela. Telef.: (+58 241) 8222606 – 8222608 – 8222613 – 8240871 8226289. Fax. + 58-241-8212121. Horario de Oficina: 8:00 a.m. a 12:00 m y 2:00 p.m a 5:00 p.m.

FundaCid contribuye permanentemente con la difusión vía Internet de la Revista Salus a través del URL:
<http://servicio.cid.uc.edu.ve/fcs/>

Mantenimiento y transporte del *Blastocystis sp.* en condiciones de vitalidad.

Emilia Barrios^{1,2}, Stanisfel Castillo¹, Eurimar Goitia¹, Olga Ojeda¹, Wolfan Araque¹, Víctor Delgado¹

RESUMEN

El *Blastocystis sp* es un protozooario con alta prevalencia en Venezuela. Es controversial por su papel patógeno y su gran variabilidad genética, relacionada con la dificultad de mantenerlo en condiciones de viabilidad fuera del hospedador. Se evaluó la utilidad de los medios de cultivo *in vitro* RPMI1640, TB1, MBD y MBDM para mantener la viabilidad del *Blastocystis sp*. Se seleccionaron 97 muestras de heces, 43 (44%) de las cuales resultaron positivas solo para *Blastocystis sp* y de 15 de ellas se purificaron los *Blastocystis sp* mediante gradiente (ficoll-diatrizoato de sodio). En cada medio de cultivo y en solución salina 0,85% (SSI) se inoculó 1×10^3 parásitos por paciente y se evaluó la viabilidad mediante coloración con azul de tripano a las 24, 48 y 72 horas. Los resultados mostraron porcentajes de viabilidad a las 24 h: en SSI de 2%, en RPMI1640 5%, en TB1 5%, MBD 24% y MBDM 40%. A las 48 h: en SSI de 3%, en RPMI1640 4%, en TB1 4%, MBD 17% y MBDM 21%. A las 72 h: en SSI 2%, en RPMI1640 2%, en TB1 2%, MBD 15% y MBDM 16%. Se observaron diferencias estadísticamente significativas después de las 24 h, entre los medios TB1, MBD y MBDM comparado con SSI. Se concluye que el medio MBDM es el que ofrece las mejores condiciones para mantener viable a *Blastocystis sp* por 72 h.

Palabras clave: *Blastocystis sp*, cultivo *in vitro*, gradiente de concentración.

ABSTRACT

Maintenance and transport *Blastocystis sp* in conditions of vitality

The protozoan *Blastocystis sp* is a high prevalence in Venezuela. Its role is controversial pathogen and its wide genetic variability related to the difficulty of keeping it in a position outside the host viability. We evaluated the utility of *in vitro* culture media RPMI1640, TB1, and MBDM MBD to maintain the vitality of *Blastocystis sp*. They selected 97 stool samples, 43 (44%) of which were positive for *Blastocystis sp* and only 15 of them were purified by gradient *Blastocystis sp* (ficoll-sodium diatrizoate). In each culture medium

and 0.85% saline (SSI) is inoculated 1×10^3 parasites per patient and viability was assessed by trypan blue staining after 24, 48 and 72 hours. The results showed viability percentage after 24 hours: in SSI of 2%, 5% RPMI1640 at TB1 5%, 24% and MBDM MBD 40%. After 48 h: SSI 3% in RPMI1640 4%, 4% TB1, MBD MBDM 17% and 21%. After 72 h: SSI 2% in RPMI1640 2%, 2% TB1, MBD 15% and 16% MBDM. Statistically significant differences were observed after 24 h, between TB1 media, compared MBDM MBD and SSI. We conclude that the medium is MBDM which offers the best conditions for maintaining viable *Blastocystis sp* for 72 h.

Key words: *Blastocystis sp*, *in vitro* culture, the concentration gradient.

INTRODUCCION

El *Blastocystis sp* es un parásito pleomórfico común en el tracto intestinal humano (1). Caracterizado por presentar tres morfologías principales: vacuolada, que posee una gran vacuola central, y escaso citoplasma que contiene organelas y varios núcleos. Generalmente es esférica, midiendo entre 2 a 200 μm de diámetro, aunque en algunos cultivos axénicos se han descrito formas gigantes de 400 μm . La granulada, que posee una gran cantidad de mitocondrias, lo que le confiere el aspecto granular. Y la forma vacuolada que en tamaño es parecida a la granular, caracterizada por la presencia de granulaciones citoplasmáticas y dentro de la vacuola, funciones metabólicas y reproductivas variables, y es frecuentemente observada en cultivos con antibióticos o que no han sido axenizados. La forma amebode, caracterizada por su capacidad de emitir 1 ó 2 pseudópodos involucrados principalmente en la fagocitosis de bacterias más que en la motilidad del parásito, es esporádicamente encontrada en heces diarreicas. La forma quística es la de menor tamaño 2 a 5 μm , de forma ovoidea o esférica y con una pared de múltiples capas que puede presentar, o no, otra cubierta laxa. En su interior se observan varios núcleos, pequeñas vacuolas y otras organelas. Son las formas más resistentes, pudiendo permanecer viables un mes a 25 °C y 2 meses a 4 °C, son las responsables de la transmisión que genera la infección de manera fecal-oral o por medios de agua o alimentos contaminados con heces infectadas (2, 3, 4).

En cuanto a la frecuencia de aparición, las formas con cuerpo central o vacuolada y las formas granulosas son las más frecuentes en las heces de personas asintomáticas, aunque se han encontrado diferencias significativas en el número y formas observadas en las heces entre las personas sintomáticas y asintomáticas.

¹ Laboratorio de Helminología del Instituto de Biología Molecular de Parásitos (Instituto BioMolP).

² Departamento de Investigación y Desarrollo Profesional, Escuela de Bioanálisis. Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad de Carabobo. Valencia, Venezuela.

Correspondencia: Emilia Barrios

E-mail: barrios.emilia@gmail.com

Los quistes se encuentran principalmente en las heces de personas asintomáticas, la forma ameboide solamente se ha visto en individuos sintomáticos. Todas estas variantes morfológicas también se observan en los cultivos. Además se ha demostrado asociación entre la alta carga parasitaria y la morfología encontrada para apreciar síntomas como diarrea, dolor abdominal, anorexia, fatiga, vómitos y flatulencia (1, 5, 6).

La re-emergencia de la infección por *Blastocystis sp* en humanos y su controversial rol patógeno ha despertado el interés de definir la taxonomía del parásito, debido a su controversial ubicación en el phylum Stramenophila (7), y a los muchos organismos similares a *Blastocystis sp* encontrados en una variedad de animales, incluyendo mamíferos, aves, reptiles y en raras ocasiones, los insectos.

Apesar que *Blastocystis sp* ha sido aceptado como la especie aislada de humanos, los parásitos provenientes de otros huéspedes son reportados bajo la misma denominación o seguido el nombre de la especie de procedencia (7).

No obstante, *Blastocystis sp* es morfológica y genéticamente un organismo polimórfico y el hecho de observar diferencias morfológicas podría no significar que sea una nueva especie. La descripción de diferentes perfiles proteicos, cariotipos y zimodemas combinados con otros aspectos como condiciones de crecimiento, tipos de células y secuencias de genes constituyen pruebas de la posible existencia de poblaciones morfológicamente idénticas, que quizás estén dotadas de un potencial patogénico diferente. Sin embargo, existen pruebas de que estos criterios no se correlacionan entre sí, y por lo tanto la especiación en el género *Blastocystis* sigue siendo controversial (7).

Actualmente, se considera que existen 9 subtipos y se ha propuesto la eliminación de la nomenclatura *Blastocystis hominis* y reemplazarla por la de *Blastocystis sp*, seguida de la indicación del subtipo de 1 a 9 en los aislamientos de aves y/o mamíferos (8). El subtipo 1 se asocia a varios mamíferos y aves, el subtipo 2 está asociado a primates y cerdos, el subtipo 3 es el genotipo más frecuentemente hallado en humanos, el subtipo 4 se asocia a roedores, el subtipo 5 está relacionado con el ganado vacuno y con cerdos, los subtipos 6 y 7 son frecuentemente aislados de aves; por último, los subtipos 8 y 9 están estrechamente vinculados con los subtipos 4 y 6, respectivamente (9). Adicionalmente, es posible la existencia de un subtipo 10 aislado en primates (9). Otros autores señalan la probable existencia de diferentes especies de este género, pasando el subtipo 3 a ser realmente *B. hominis* (10).

Este protozooario, constituyen un grupo de importancia dentro de los parásitos intestinales, variando su prevalencia y patogenicidad de acuerdo a ciertos factores propios del agente o del hospedador, y también es considerado actualmente un patógeno emergente o reemergente, reportándose con frecuencia en infecciones sintomáticas o asintomáticas (11).

Se ha demostrado que el *Blastocystis sp*, no invade la mucosa del colon, pero conduce a perturbaciones en la barrera epitelial y permeabilidad, provocando infiltración de células inflamatorias en la mucosa, pero no en todos los huéspedes.

El efecto citopático de *Blastocystis sp* subtipo 4 en líneas celulares epiteliales de rata muestran que el parásito es capaz de producir enzimas hidrolasas que inducen apoptosis y aumento en la permeabilidad de la membrana epitelial, independientemente que el parásito entre en contacto con la membrana. El subtipo 1 se asocia a efectos pro-inflamatorios entre ellos secreción del IL-8 y el subtipo 7 con modulación de la respuesta humoral IgA, así como producción de cistein proteasas que favorecen la supervivencia del parásito (12).

El avance en diagnóstico, en la caracterización fenotípica y genotípica de otros protozoarios es resultado de técnicas que requieren una óptima obtención de estadios parasitarios, entre ellas el cultivo y mantenimiento *in vitro*, que en el caso de *Blastocystis sp* no se encuentran disponibles, a pesar de que se conoce que es posible su cultivo. Esto hace difícil el estudio de la epidemiología molecular de la blastocitosis e incrementa la controversia en relación a sus características morfológicas, ciclo vital y rol como patógeno de *Blastocystis* (5,10).

Para ir más allá de las descripciones morfológicas o patológicas asociadas es necesario evaluar la utilidad de los medios de cultivos axénicos en el mantenimiento de la viabilidad del *Blastocystis sp*, debido a su labilidad y difícil mantenimiento *in vivo* e *in vitro* (13).

En relación a *Blastocystis sp*, el cultivo por 72 horas en medio Boeck-Drbohlav (MBD) reveló el marcado polimorfismo previamente descrito para este organismo, observándose las formas con cuerpo central, forma granulosa, forma ameboide, y los quistes (14).

En el medio Boeck-Drbohlav modificado (MBDM), La axenización se consiguió en 21 aislados, pero únicamente 18 lograron mantenerse viables *in vitro*, lo que supone un éxito de un 47,4%. Sin embargo, hasta los momentos no se dispone de un medio de transporte o mantenimiento estandarizado, que garantice la viabilidad, multiplicación y sobrevivencia de estos protozoarios (15).

Por su parte el medio TB1 medio de cultivo libre de suero resulto ser eficaz en el mantenimiento de trofozoitos de *Trichomonas vaginalis* manteniéndolos viables por un período de 7 días (16).

El objetivo de este estudio fue evaluar la utilidad de medios axénicos líquidos (RPM11640) semi-sólidos (TB1) y bifásicos (MBD, MBDM), en mantener la viabilidad del *Blastocystis sp* basado en experiencias exitosas con este y otros protozoarios, a fin de la obtención óptima de formas parasitarias de *Blastocystis sp* a emplear en posteriores

estudios, que permitan dilucidar papel patógeno, mejorar el diagnóstico microscópico, serológico y molecular de pacientes con sintomatología e identificar portadores sanos

MATERIAL Y METODOS

En el estudio se emplearon 15 aislados de *Blastocystis sp* obtenidas de pacientes infectados, provenientes del Edo. Carabobo y procesados en el Laboratorio de Helmintos del Instituto de Biología Molecular de Parásitos (Instituto BioMolP). Los pacientes fueron informados de los objetivos de la investigación y una vez obtenido su consentimiento escrito de participar en el estudio y dadas las instrucciones adecuadas para la recolección de la muestra, las muestras de heces fueron procesadas. Se emplearon los métodos: directo con solución salina isotónica (0,85% P/V), Lugol, Baerman, Kato, además de la coloración Kinyoun, a fin de descartar la presencia de *Strongyloides stercoralis* y otros helmintos, coccidios (*Cyclospora sp*, *Cryptosporidium parvum* e *Isospora belli*), que puedan ocasionar sintomatología similar al *Blastocystis sp*. Las muestras positivas sólo para *Blastocystis sp*, se les realizó un conteo de formas parasitarias por campo, utilizando el objetivo de 40X, en diez campos consecutivos.

Aquellas muestras con 5 o más parásitos por campo, fueron resuspendidas en Solución Salina Isotónica (SSI 0,85% p/v) y tamizadas para eliminar detritus celulares y restos alimenticios. Luego se resuspendió en SSI 0,85% p/v suplementada con antibióticos (100 µg de estreptomina/ml y 100 UI de penicilina /ml de SSI) y se realizaron cuatro lavados de 10 min a 3500 rpm, para eliminar bacterias.

Al finalizar los lavados, se resuspendió el sedimento con SSI hasta un volumen conocido, y se realizó un conteo diferencial por duplicado, con respecto a las morfologías encontradas de *Blastocystis sp* en 20 µl de la resuspensión, empleando objetivo de 40X.

Las muestras confirmadas con *Blastocystis sp* fueron fijadas con metanol para realizar la coloración May Grünwald – Giemsa.

Aislamiento y Concentración de *Blastocystis sp*.

La separación de las formas parasitarias, de detritus alimenticios y el resto de las heces, se empleó el gradiente ficol (0,5% p/v)-diatrizoato de sodio (16% p/v) (17), después de centrifugación a 3000 rpm por 30 minutos, los parásitos en la interface (anillo) se colectaron y lavaron dos veces con solución salina isotónica (0,85% p/v) estéril, para proceder con el conteo de los parásitos que corresponde al tiempo 0 y ser inoculados en los medios y soluciones de cultivo.

Una gota de esta suspensión se colocó sobre una lámina portaobjetos y se fijó con metanol para realizar la coloración May Grünwald – Giemsa, para ello se añadieron unas gotas de May-Grünwald a la lámina previamente fijada, se dejó actuar durante 10 minutos, pasado este tiempo, se lavó con

tampón PBS (0,15M, pH 7,4) y se le añadió unas gotas de Giemsa diluida 1:5 en agua destilada, se dejó actuar durante 20 minutos, se lavó la lámina con PBS nuevamente y se secó a temperatura ambiente. Posteriormente, las láminas coloreadas se observaron al microscopio con objetivo de 100X y se hizo registro fotográfico en un fotomicroscopio Nikon E600 con cámara acoplada (Coolpix 995).

Preparación de medios y soluciones de cultivo.

Solución de Locke. Se preparó según protocolo por Lanuza *et al.* (14), para ello los componentes, cloruro sódico 1,6%, cloruro potásico 0,04%, fosfato de sodio 0,4%, bicarbonato sódico 0,08%, fosfato monopotásico 0,08%, glucosa 0,5%, cloruro cálcico 0,04% y cloruro de magnesio 0,002%, fueron disueltos en agua destilada y ajustados a pH: 7.2 con un peachimetro orion modelo 230 A y se esterizaron en autoclave a 121°C, durante 20 minutos, excepto la glucosa que fue filtrada en Millipore 0,22 µm.

Medio bifásico Boeck-Drbohlav modificado (MBDM). La fase líquida consistió en la solución de Locke modificada suplementada con suero mientras que la fase sólida se preparó con una ovosuspensión en solución de Locke modificada 4:1 v/v emulsionada y luego coagulada en baño a 80°C, 30 minutos en cuñas de 3 a 4 cm de longitud en tubos de vidrio de 16 x 160 mm. Los tubos se esterizaron en autoclave (121°C, 15 minutos) y se almacenaron a 4°C, hasta su utilización (15).

Medio bifásico de Boeck-Drbohlav modificado (BDM): La fase sólida se preparó mezclando el huevo con sangre humana desfibrinada, esterilizada a 80°C, y luego se adicionó solución Ringer estéril comercial (14).

Medio Roswell Park Memorial Institute (RPMI-1640): Se empleó la fórmula desarrollada por Moore *et al.* (18), en Roswell Park Memorial Institute, de ahí el acrónimo RPMI comercializada (SIGMA) liofilizada suplementado con L-glutamina y bicarbonato de sodio, diluida en agua destilada ajustada pH a 7.0 esterilizada por filtración, se almacenó a 4 °C hasta su uso (18).

Medio TB1: Medio Semi-Sólido Compuesto por Tripticasa 1,5 %, extracto de carne 1,5 %, extracto de levadura 1,5 %, peptona 0,5%, hígado desecado 1,5%, glucosa 0,5 % , hierro 300 mg, y agua destilada (16).

Inoculación de *Blastocystis* en los diferentes Medios de Cultivo.

En cada medio o solución de cultivo se inoculó $1,2 \times 10^4$ *Blastocystis sp* purificados y 100% viables, empleándose como condición control sin medio, solución salina isotónica (NaCl 0,85% p/v). La viabilidad de los parásitos fue evaluada mediante el test del colorante, contando 20 µl de parásitos purificados con 10 µl de azul de tripan 0,2% p/v en PBS (0,15 M pH 7,2) y se realizó conteo de parásitos al

microscopio. Los parásitos intactos sin colorante (viables), y los coloreados (muertos), para estimar el porcentaje de viabilidad. Los cultivos se incubaron a 37°C en atmósfera anaeróbica, obtenida mediante la adición de 1 ml de Agar al 2%. Una vez adaptado el parásito a las condiciones *in vitro* (13, 14).

Determinación de la vitalidad de *Blastocystis sp* en medios y soluciones. A las 0, 24, 48 y 72 horas, se tomaron 20 µl de cada medio de cultivo, adicionándole 10 µl de azul de tripano al 1% en PBS y se realizó conteo de parásitos al microscopio los parásitos intactos sin colorante (viables) y los coloreados (muertos), para estimar el porcentaje de vitalidad.

Análisis de los resultados. Se utilizó una prueba de normalidad para estimar la distribución de las variables. Los conteos promedios de las muestras antes y después del gradiente, fueron expresados como promedio \pm desviación estándar ($X \pm DE$) y en porcentaje (%). La viabilidad como el porcentaje promedio de parásitos que sobrevivieron a las 24, 48 y 72 horas en cada medio de cultivo, tomando el inóculo en el tiempo 0 como el 100%. La comparación de la viabilidad de los parásitos entre medios de cultivo se realizó mediante una prueba T. En el análisis estadístico se empleó el programa STATISTICA versión 8.0.

RESULTADOS

La infección mixta de *Blastocystis sp* con otros parásitos fue con *Endolimax nana* 7(7%), *Entamoeba coli* 4 (4%) y *Giardia lamblia* 3(3%). En las muestras exclusivamente positivas para *Blastocystis sp* se encontró que: 28 (65%) eran pastosa, 11 (26%) blandas, 3(7%) duras y sólo un 2% era diarreica. Mientras que, las 15 muestras procesadas para cultivo *in vitro*, fueron: pastosas 8 (53,3%) y blandas 7 (46,6%).

En cuanto número y tipos morfológicos encontrados, el promedio de *Blastocystis sp* en las muestras incorporadas al estudio fue aproximadamente $9,1 \times 10^6$ protozoarios por µl, de los cuales $5,9 \times 10^6 \pm 3,1 \times 10^6$ (65,12%) correspondían a formas granulares y $3,1 \times 10^6 \pm 2,8 \times 10^5$ (34,88%) a formas vacuolares.

Luego de la purificación mediante gradiente se obtuvo $1,2 \times 10^4$ *Blastocystis sp* por µl, de ellos $6,5 \times 10^4 \pm 4,4 \times 10^4$ (59,25%) eran granulares y $4,5 \times 10^4 \pm 2,2 \times 10^4$ (40,74%) vacuolares.

La coloración de May Grünwald-Giemsa empleada en la confirmación de la identificación morfológica, resultó satisfactoria, ya que se pudo diferenciar características morfológicas del parásito, como granulaciones, núcleos a la periferia y la vacuola central limitada por un citoplasma escaso.

Por lo cual se propone a esta coloración entre las adecuadas para la observación de *Blastocystis sp* (figura 1).

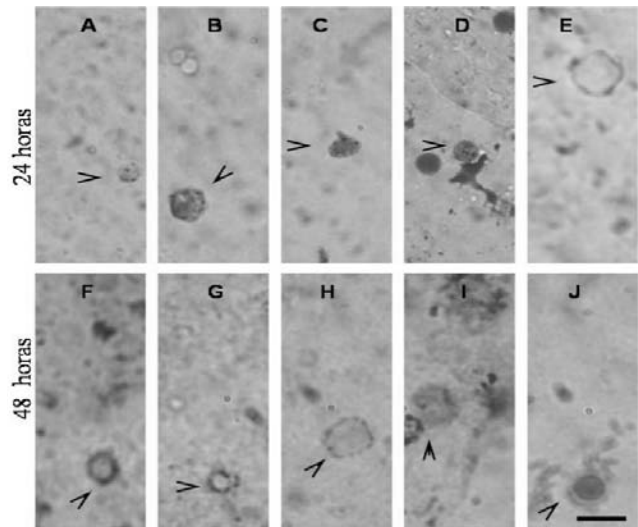


Figura 1. *Blastocystis sp.* Teñidos con May-Grunwald-Giemsa, formas granulares (cabeza de flecha, A-D, I) y vacuolares (E- H y J). Barra: 10 µm.

En el cultivo *in vitro* de *Blastocystis sp*, luego de 24 horas los conteos de viabilidad en SSI y los medios de cultivo (Figura 2, Tabla 1) mostraron que los medios RPMI1640 y TB1 en comparación con la SSI, solo lograron 3% más de viabilidad, mientras que en el MBD su capacidad de mantener viables los parásitos fue doce veces mayor a la SSI y aproximadamente cinco veces más en comparación con el RPMI1640 y el TB1.

Sin embargo, el medio MBDM resultó ser superior a todos los medios, no sólo fue diez veces mejor que la SSI y ocho veces mejor al RPMI1640 y TB1, sino que casi dos veces superior al MBD clásico, hasta las 48 horas. No obstante, todos los medios incluidos los medios bifásicos MBD y MBDM disminuyeron con el tiempo, su capacidad de mantener los parásitos viables.

Cabe resaltar que las diferencias fueron estadísticamente significativas entre TB1, MBD y MBDM en relación a SSI, a las 24 y 48 horas, mientras que a las 72 horas solo MBD y MBDM. DISCUSIÓN

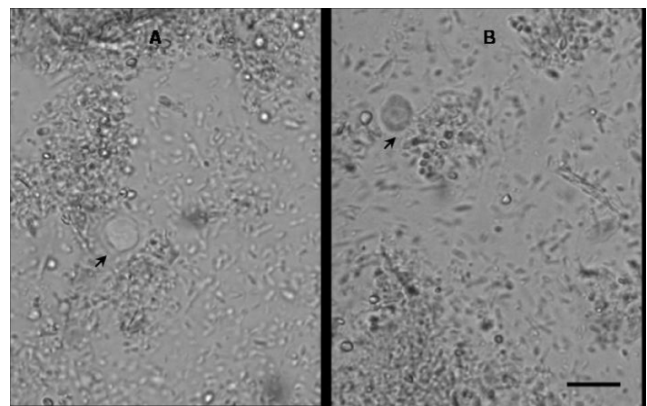


Figura 2. *Blastocystis sp.* Mantenidos en SSI por 24 horas y procesados con azul tripan, en A forma vacuolar viable y en B no viable. Barra: 25µm.

Tabla 1. *Blastocystis sp* en solución salina y en medios de cultivo a las 24, 48 y 72 horas de cultivo, expresados en promedio±desviación estándar y en porcentaje de vitalidad en comparación con el inóculo inicial (0 horas).

Tiempo	Medio de cultivo	SSI	RPMI1640	TB1	MBD	MBDM
0 horas			12000±1043			
24 horas	Promedio	479	1067	1405	9787	11406
	DS	299	620	803	714	543
	% de viabilidad	2	5	5	24	40
	p	0,09	*0,05	*0,02	*0,001	
48 horas	Promedio	260	508	827	4021	4261
	DS	233	443	601	785	1200
	% de viabilidad	2	2	3	13	18
	p	0,08	*0,03	*0,003	*0,002	
72 horas	Promedio	183	334	600	2635	7188
	DS	143	273	540	443	4250
	% de viabilidad	2	2	2	15	16
	p	0,1	0,09	*0,001	*0,003	

El cultivo axénico de protozoarios es ampliamente empleado en el estudio de la biología, epidemiología, protocolos de infectividad o de fuentes de estadios parasitarios útiles en el desarrollo de técnicas inmunodiagnósticas. En el presente estudio se evaluó la utilidad de medios axénicos líquidos, semi-sólidos y bifásicos en mantener la vitalidad de *Blastocystis sp*.

Inicialmente en la fase de diagnóstico y selección de las muestras idóneas para cultivo *in vitro*, se encontró asociación con otros protozoarios, resultando interesante que a pesar de ello la consistencia de las heces predominante no fue diarreica, ya que otros autores relacionan una alta asociación entre *Endolimax nana* y *Blastocystis sp*, con diarrea en niños, cuando la infección se produce con una alta carga parasitaria (19), sin embargo, los resultados obtenidos sugieren que *Blastocystis sp* solo o asociado a *E. nana* en el tracto gastrointestinal puede prevalecer en gran número, sin generar algún cambio en la consistencia normal de las heces. En relación a la presencia de infección mixta, otros autores encontraron resultados similares a los del presente estudio, excepto que encontraron una asociación menor entre *Blastocystis sp* y *E. nana* (20).

De acuerdo a los resultados obtenidos al estimar el número de parásitos antes y después del gradiente, se mantiene la relación de formas vacuolares y granulares en los contajes pre y post gradiente, corroborando estudios previos de nuestro grupo de investigación en los que se demostró que el gradiente con Ficol-Diatrizoato no influye en la proporción de morfologías presentes en la muestra (21).

En cuanto al tipo de morfología predominante, otros autores reportan un predominio de 5 o más formas vacuolares por campo en pacientes sintomáticos (22), contrario a lo observado en esta investigación. La discrepancia con los resultados de esta investigación pudiera relacionarse con la consistencia de las heces, en su mayoría pastosas, más que al número de parásitos encontrados, puesto que en otra

investigación se observó en pacientes con infección única por *Blastocystis sp* y síntomas, que 68,4% presentaban 5 o más vacuolares por campo (23).

Los detalles morfológicos e intracelular observados en los *Blastocystis sp* con la tinción de May Grünwald-Giemsa sustenta un estudio previo (21) que demostró que este método de coloración puede ofrecer una alternativa a otras coloración la observación de *Blastocystis sp* (figura 1), por de simple ejecución y requerir menos grupos cromógenos en su preparación. Contrario a otros estudios enfatizan la necesidad de usar al menos cinco tipos de tinciones para diferenciar entre distintas morfologías de *Blastocystis sp*. y concluyendo que los mejores colorantes para identificarlo serían: Azul metileno- safranina y la de Zielhl - Neelsen modificada (24).

El cultivo *in vitro* de *Blastocystis sp* es considerado un método que aumenta la sensibilidad de la detección en relación al método directo, rutinariamente aplicado en la mayoría de los laboratorios (24). No obstante, de los medios de cultivo empleados en el presente estudio, solo dos mostraron utilidad en mantener la viabilidad de *Blastocystis sp* hasta 72 horas, en condiciones de microaerofilia, sugiriendo que pueden ser empleados en estudios posteriores (epidemiología molecular, caracterización de antígenos para inmunodiagnóstico o estudios de la biología y pruebas con fármacos).

Es importante resaltar que en todos los experimentos fueron realizados sin reemplazar medio, para evitar que la que las distintas consistencias de estos pudiesen producir variaciones en los contajes de los parásitos, lo cual podría haber contribuido a la disminución de la vitalidad a medida que transcurría el tiempo en cultivo, debido a agotamiento de los nutrientes en el medio. De igual forma, el empleo de una capa de agar para disminuir la tensión de oxígeno en el medio, no constituye un sistema de anaerobiosis estricta, que también pudiera haber afectado la supervivencia de los

parásitos, de metabolismo anaerobio conocido(15). Quizás debido a ello, el medio MBDM resulto medianamente eficaz para mantener la viabilidad, pero no hubo multiplicación del parásito como se reporta en otros estudios, que establecen que los medios de cultivo idóneos para este parásito es el medio bifásico de Boeck- Drbohlav, inicialmente descrito para *Entamoeba histolytica*, proporcionaba un adecuado crecimiento para *Blastocystis sp.* Además, observaron mejores resultados en medios pre-reducidos durante 48 horas, con una fase líquida constituida por solución de Locke y suero inactivado (bovino, caballo, conejo o humano) al 30% e incubados a 37°C en atmósfera anaerobia (15).

Otros autores señalan que la incubación de *Blastocystis sp* a 37 °C en medios anaerobios pre-reducidos brinda un crecimiento óptimo del organismo aislado de humanos, para aumentar la sensibilidad del diagnóstico, pero no reportan tiempos de mantenimiento en cultivo, % de vitalidad ni de multiplicación del parásito (16,25).

Además de los medios de cultivo de Boeck y Drbohlav habitualmente usados, se han desarrollado con éxito el Iscove modificado y Dulbecco suplementado con suero equino al 10% (2, 14 ,15), no obstante, la mayoría de estos ensayos se han desarrollado en cultivos de *Blastocystis sp* establecidos, no con parásitos provenientes de heces humanas por individual ni midiendo la capacidad de multiplicación o mantenimiento de los medios.

En relación al medio TB1, considerado como un medio de mantenimiento ideal para *Trichomonas vaginalis* puesto que alcanzó una tasa de crecimiento con niveles máximos de crecimiento a las 48 y 72 horas, después de la inoculación. Este medio podría utilizarse eficazmente en el aislamiento y mantenimiento del cultivo *in vitro* de *T. vaginalis*, pero resultó poco eficiente para el mantenimiento de *Blastocystis sp* (16,25).

Igualmente resulta contradictorio que un medio altamente enriquecido y ampliamente utilizado en el mantenimiento en cultivo de linfocitos, como el RPMI1640 (26) y de alto costo, mostró ser similar a la SSI para conservar la viabilidad del *Blastocystis sp.*

A pesar de que no se logró la multiplicación en cultivo, los resultados obtenidos con los medios ensayados demuestran que estos son capaces de mantener mayor número de parásitos viables en comparación con la SSI, por lo que representa una alternativa para el transporte y mantenimiento de los *Blastocystis* dentro de las 24 horas, y representan una primera aproximación a la estandarización del cultivo *in vitro*, puesto que optimizando el reemplazo de nutrientes y tensión de oxígeno, podrían aumentar el tiempo de viabilidad y favorecer la multiplicación.

En conclusión, los medios bifásicos MBD y MBDM constituyen los más adecuados para el mantenimiento de transporte de *Blastocystis sp* proveniente de muestras de heces de pacientes infectados.

AGRADECIMIENTO. Este trabajo se realizó con el financiamiento del Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico de la Universidad de Carabobo a través del Proyecto de Inversión Menor CDCH-UC-AM # 0466-10.

REFERENCIAS

1. Eymael D, Schuh G, Tayares R. Standarizacion of *Blastocystis hominis* diagnóstico using different staining techniques. Rev Soc Bras Med Trop 2010; 43(3) 309-312.
2. Salinas J, Gonzales H. Infección por *Blastocystis*. Rev Gastroenterol 2007; 27(3) 264-274.
3. Velarde L, Mendoza M. Prevalencia de *Blastocystis hominis* en menores de 12 años de una población mexicana urbana. Rev. Cubana Pediatr 2006 disponible en línea: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-75312006000400006
4. Kozubsky L, Archelli S. Algunas consideraciones acerca de *Blastocystis sp*, un parásito controversial. Acta Bioquím Clín Latinoam 2010; 44(3): 371-6.
5. Stensvold C, Arendrup M, Jespersgaard C, Molbak K, Nielsen H. Detecting *Blastocystis* using parasitologic and DNA-based methods: a comparative study. Diagn Microbiol Infect Dis. 2007; 59(3):303-7.
6. Guzmán R, Vethencourt C, Galindo M, Chacón M, Wagner N, Nessi C, Paduani A. Comportamiento Biológico de *Blastocystis hominis* en Pacientes Tratados con Secnidazol Unidazol Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología 2008; 28 (1) 66-71.
7. Yoshikawa H, Morimoto K, Wu Z, Singh M, Hashimoto T. Problems in speciation in the genus *Blastocystis* TRENDS in Parasitology 2004; 20 (6): 251-5.
8. Stensvold C, Suresh G, Tan K, Thompson R, Trau R, Viscogliosi E, et al. Terminology for *Blastocystis* subtypes-a consensus. Trends Parasitol 2007; 23 (3):93-6.
9. Hoevers J, Holman P, Logan K, Hommel M, Ashford R, Snowden K. Restriction-fragment-length polymorphism analysis of small-subunit rRNA genes of *Blastocystis hominis* isolates from geographically diverse human hosts. Parasitol Res 2000; 86(1): 57-61.
10. Requena I, Hernández Y, Ramsay M, Salazar C, Devera R. Prevalence of *Blastocystis hominis* among foodhandlers from Caroni municipality, Bolivar State, Venezuela. Cad Saúde Pública 2003; 19(6):1721-1727.
11. Poirier P, Wawrzyniak I, Vivarès C, Delbac F, Alaoui H. New Insights into *Blastocystis spp.* A Potential Link with Irritable Bowel Syndrome. PLoS Pathog 2012; 8(3): 002545.
12. Graham C, Diamond L. Methods for cultivation of luminal parasitic protists of clinical importance. Clin Microbiol Rev 2002; 15(3): 329-341.

13. Domínguez V. Heterogeneidad genética de *Blastocystis hominis*: implicaciones patogénicas. Universidad de Valencia, Tesis Doctoral 2003; p 113-118. Recuperado el 30 de mayo de 2008. Disponible en línea: <http://www.tdx.cat/handle/10803/10099>
14. Guzmán C, Arrechdera H, Pérez E. Ultraestructura de *Blastocystis hominis* y su enquistamiento en cultivo polixénico. VITAE 2007. Disponible en línea: <http://vitae.ucv.ve/?module=articulo&rv=15&n=382&m=3&e=602>
15. Moore G, Gerner R, Franklin H. Culture of Normal Human Leukocytes. JAMA, 2007; 199:519-524.
16. Limoncu M, Kilimcioğlu A, Kurt Ö, Östan İ, Özkütük N, Özbilgin A. Two novel serum-free media for the culture of *Trichomonas vaginalis*. Parasitol Res 2007; 100 (3):599-602.
17. Weber R, Juranek D, Bryan R. Improved stool concentration procedure for Detection of *Cryptosporidium oocysts* in fecal specimens. J. Clin. Microbiol 1992; 30:2869-2873.
18. Zhang X, Qiao J, Zhou X, Yao F, Wei Z. Morphology and reproductive mode of *Blastocystis hominis* in diarrhea and *in vitro*. Parasitol Res. 2007; 101(1):43-51.
19. Graczyk T, Shiff C, Tamang L, Munsaka F, Beitin A, Moss W. The association of *Blastocystis hominis* and *Endolimax nana* with diarrheal stools in Zambian school-age children. Parasitol Res 2005; 98(1):38-43.
20. Carrero S, Carrero M, Pérez M, Carrero J. Prevalencia de *Blastocystis hominis* en Pacientes sintomáticos. Med-ULA 1999; 5(1-4): 48-55.
21. Sánchez L, Barrios E, Sardina A, Araque W, Delgado V. Infectividad y virulencia de aislados humanos de *Blastocystis hominis* en ratones inmunosuprimidos. Kasmera 2012; 40: 67-77.
22. Tan K S W. New insights on classification, identification, and clinical relevance of *Blastocystis spp*. Clin Microbiol Rev 2008; 21 (4): 639-665.
23. Chourio L, Díaz I, Casas M, Sánchez M, Torres L, Luna M, Corzo G. Epidemiología y patogenicidad de *Blastocystis hominis* 1999; 27(2):77-102.
24. Weber, R., Juranek, D., Bryan, R. Improved stool concentration procedure for Detection of *Cryptosporidium oocysts* in fecal specimens. J. Clin. Microbiol 1992; 30:2869-2873.
25. Suresh K, Smith H. Comparison of methods for detecting *Blastocystis hominis*. Clin Microbiol Infect Dis 2004; 23: 509-511.
26. Solís M, Alvarado M, Ruiz E, Carrillo J, Navarrete M, Sánchez G, et al. Citogenética y citoquímica de pacientes con leucemia en dos hospitales neotropicales. Rev boil trop 2000; 48: 2-3.



Salus online



Revista de la Facultad de Ciencias de la Salud-Universidad de Carabobo

INICIO INDICE AUTORIDADES ENLACES DE INTERES CONTACTOS

Bienvenidos a *Salus online* La Revista de la Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad de Carabobo

Salus es el órgano oficial de divulgación científica de la Facultad de ciencias de la Salud de la Universidad de Carabobo. Está destinada a la publicación de trabajos de investigación que realicen los miembros de la Comunidad Universitaria y de otras instituciones de Educación Superior, Nacionales e internacionales.

Salus online sólo reproducirá los artículos aprobados para su publicación por el Comité editor de acuerdo a los requisitos de la edición impresa. Los autores deberán seguir enviando sus originales a la dirección habitual de la revista.

Salus online sólo reproducirá los últimos números de *Salus*, mientras que la colección completa se la podrá encontrar, como siempre, en la página del CID.

Director Editor
Ricardo Montoreano

<http://servicio.cid.uc.edu.ve/fcs/>
<http://salus-online.fcs.uc.edu.ve/>



Efecto de los microorganismos acuáticos (rotífera y ciliata) sobre la emisión de cercarias de *Schistosoma mansoni*, por *Biomphalaria glabrata* en el laboratorio.

María Gabriela Barrios¹, Emilia Elena Barrios^{1,2}, María Lorena Marquez³, Rowhiny Hernández¹, Juan Fernando Quintana⁴, Olga Ojeda¹

RESUMEN

Los rotíferos y ciliados son microorganismos que cohabitan con *B. glabrata*, y en el caracol infectado comparten espacio con el parásito *S. mansoni*, agente causal de la esquistosomosis. La experiencia con crías en cautiverio sugiere que la presencia de tales microorganismos puede afectar la evolución del parásito en el caracol, debido a competencia por espacio y nutrientes. En base a esto se evaluó el efecto de los rotíferos y ciliados, sobre la emisión de cercarias de *S. mansoni* por el molusco *B. glabrata* mantenida en cautiverio. En los experimentos se emplearon cinco grupos de 10 caracoles infectados con 10 miracidios de *S. mansoni*, los cuales, se colocaron en recipientes plásticos, con: (a) 87500 rotíferos y 25000 *Paramecium sp.*, (b) 27000 rotíferos y 54000 *Paramecium sp.*, (c) 800000 rotíferos, (d) 4500 *Paramecium sp.* y rotíferos, respectivamente y (e) el grupo control de infección se mantuvo sin rotíferos y ciliados. Se demostró un efecto de inhibición en la emisión de las cercarias de *S. mansoni* en presencia de rotíferos y *Paramecium sp.*, dependiente de la cantidad de organismos presentes. El porcentaje de inhibición en la emisión de las cercarias de *S. mansoni* se relacionó con la presencia de un gran número de rotíferos. El presente trabajo constituye el primer hallazgo que sugiere que organismos de los phylum Rotifera y Ciliophora podrían ser empleados como control biológico de la infección por *S. mansoni*.

Palabras clave: *Biomphalaria glabrata*, *Schistosoma mansoni*, rotíferos, *Paramecium sp.*

ABSTRACT

Effect of aquatic organisms (rotifers and ciliate) on the issuance of *Schistosoma mansoni* larvae by *Biomphalaria glabrata* maintained in laboratory

The rotifers and ciliates are microorganisms that coexist with *B. glabrata*, Inside tissues normally infected by *S. mansoni* in the snails. the causative agent of schistosomiasis. The captive breeding experience suggests that the presence of such microorganisms can affect the evolution of the parasite in the snail, because competition for space and nutrients. The effect of rotifers and ciliates in the release of cercariae of *S. mansoni* by the mollusc *B. glabrata* maintained in captivity. The experimental setting was constituted by five groups of snails ($n=10$) infected with 10 miracidia from *S. mansoni*, which were placed in plastic containers with (a) 87500 25000 rotifers and *Paramecium sp.*, (b) 27000 54000 rotifers and *Paramecium sp.*, (c) 800000 rotifers, (d) *Paramecium sp.* 4500 and the same number of rotifers and (e) infection control group remained rotifers and ciliates. It was possible to observe an number-dependent inverse correlation between the release of cercaria from *S. mansoni* and the number of rotifers and *Paramecium sp.* Used in this study. Particularly, the percentage of inhibition was strongly associated with the presence of large numbers of rotifers. To date, these are the first findings suggesting that microorganisms from the genus ciliata, subphylum Crustacea, are capable of regulating *S. mansoni* life cycle progression in the snail stage, therefore could be potentially used as biological controls for the infection caused by *S. mansoni*.

Key words: *Biomphalaria glabrata*, *Schistosoma mansoni*, rotifers, *Paramecium sp.*

INTRODUCCION

La infección causada por el *Schistosoma mansoni*, la esquistosomosis, afecta a un promedio de 200 a 300 millones de personas a nivel mundial. Entre los continentes afectados América Latina destaca con países como República Dominicana, Puerto Rico, Surinam, Brazil y Venezuela (1).

La región centro-norte costera de Venezuela es un área geográfica que ofrece condiciones que favorecen la transmisión de este parásito, puesto que las condiciones climáticas y la presencia de los caracoles necesarios para que parte del ciclo del parásito se desarrolle se encuentran presentes, siendo esta una zona con ríos y riachuelos relacionados a actividades productivas, como la pesca o la agricultura y más recientemente la actividad turística, lo que realza la importancia de controlar la transmisión de esta infección sin alterar el ambiente ecológico (2).

¹ Laboratorio de Helmintología del Instituto de Biología Molecular de Parásitos (Instituto BioMolP).

² Departamento de Investigación y Desarrollo Profesional, Escuela de Bioanálisis. Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad de Carabobo. Valencia, Venezuela.

³ Laboratorio de Cultivo de Tejidos y Biología de Tumores. Instituto de Biología Experimental. Facultad de Ciencias. Universidad Central de Venezuela.

⁴ Centre for Immunity, Infection and Evolution, University of Edinburgh, Ashworth Laboratories, West Mains Road, EH93JT, Edinburgh, UK.

Correspondencia: Emilia Barrios.

E-mail: barrios.emilia@gmail.com

B. glabrata es una especie de caracol que habita en aguas dulces y en Venezuela, es el principal hospedador intermediario del tremátodo *S. mansoni*. El parásito en el molusco, se multiplica hasta transformarse en una larva denominada cercaria, posteriormente alcanza el medio acuático, donde al entrar en contacto con el hombre y ocasiona una enfermedad denominada esquistosomosis. La infección se caracteriza por fiebres altas, dolores abdominales, diarreas, tos, entre otras patologías en el organismo (3).

El control de la esquistosomosis en las áreas endémicas constituye una gran problemática sanitaria, debido a que una vez desarrollada en el humano, el daño a nivel hepático es irreversible, y la lesión puede ir desde daño grave hasta ocasionar la muerte al paciente por una insuficiencia hepática, fibrosis, cirrosis, e Hipertensión Portal (4). Por tanto, se ha intentado controlar la transmisión de la infección empleando sustancias molusquicidas, sin embargo, su alta toxicidad no solo para el caracol, sino también a la flora y fauna que cohabita con este, hacen del control por este medio inviable, en especial, cuando se trata de ríos, canales de riegos, represas y lagunas con fines de cultivo de peces y plantas para el consumo humano (5). Desde un punto de vista ecológico, el control biológico que no lesione el ambiente es la salida ideal, no obstante, hasta ahora las estrategias empleadas, entre ellas el uso de caracoles de otras especies que compitan por el espacio geográfico de *B. glabrata* no fueron exitosas para controlar la infección (6).

Lo anterior determina que el control de la infección se base exclusivamente en el tratamiento del paciente infectado con una droga denominada praziquantel, que actúa sobre los gusanos adultos, pero que no previene la infección ni limita las secuelas a nivel hepático o intestinal (7). Además algunas evidencias sugieren que el parásito puede desarrollar resistencia a la acción del praziquantel, ocasionando que sea deficiente como estrategia de control de la infección a dosis única (8).

La experiencia acumulada a lo largo de veinte años manteniendo el ciclo del parásito en su hospedador intermediario, *B. glabrata* en cautiverio, sugiere que microorganismos acuáticos diferentes al parásito pueden influir en el desarrollo de la infección por *S. mansoni*. A través de observaciones realizadas en las crías del Laboratorio del grupo de investigación, se ha observado una relación entre la disminución en la emisión de larvas del parásito provenientes de caracoles infectados experimentalmente y el aumento de organismos de los Phyla ses Rotífera y Ciliophora (rotíferos y *Paramecium sp.*), en el agua de las crías.

Por tanto, un mecanismo de control biológico potencial de la transmisión de la infección por *S. mansoni* al humano, podría basarse en aumentar la presencia de organismos acuáticos de vida libre como son rotíferos y ciliados, ya que al parecer estos constituyen una competencia por el espacio

en los tejidos del caracol, que parece limitar la multiplicación de las larvas del parásito y en consecuencia podrían limitar la transmisión al humano. La observación de ésta fauna acuática en condiciones de infección experimental, por lo tanto, podría aportar datos que confirmen si la existencia de dicha fauna afecta la continuidad de la infección y si podría, en consecuencia, tener efectos sobre la transmisión de la infección al humano. En tal sentido, se evaluó el efecto de los microorganismos acuáticos (rotíferos y ciliados) sobre la emisión de cercarias de *S. mansoni* por el molusco *B. glabrata* infectado.

MATERIALES Y MÉTODOS

Los caracoles *B. glabrata* y las otras especies empleadas en los procedimientos metodológicos provenían de crías mantenidas en cautiverio en el Laboratorio de Helmintología del Instituto BioMolP de la Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad de Carabobo. De igual manera, los miracidios empleados en los experimentos con caracoles infectados provenían del ciclo de mantenimiento de *Schistosoma mansoni* entre hámsters dorados (*Mesocricetus auratus*) y *B. glabrata* en el Laboratorio (9). Para ello, los hámster fueron sacrificados previa anestesia con cloroformo, a las 7 semanas de infección con cercarias de *S. mansoni* del aislado Puerto Rico. Los huevos obtenidos de hígados e intestinos fueron colocados en agua de clorinada, y estimulados con luz de una lámpara para favorecer la eclosión de los huevos y salida de los miracidios. Luego cada caracol se colocó en un pozo plástico con aproximadamente 10 miracidios recién salidos de los huevos, y se incubaron por 6 horas a temperatura ambiente.

Se emplearon cinco grupos experimentales con 10 caracoles infectados como se describió previamente. Estos se colocan los cuales, se colocaron en recipientes plásticos de aproximadamente 12x6cm, con diferentes números de ciliados y rotíferos. En el grupo 1 se emplearon 87500 rotíferos y 25000 *Paramecium sp.*, en el segundo 27000 rotíferos y 54000 *Paramecium sp.*, en el tercero 80000 rotíferos, en el cuarto, 4500 rotíferos e igual número de *Paramecium sp.* El quinto grupo de caracoles infectados se dejó sin ciliados ni rotíferos en el agua, y constituyó el grupo control de infección. Los grupos en su totalidad fueron mantenidos en recipientes de plástico rectangulares con agua de clorada y lechuga *Ad libitum*, en una proporción de un recipiente por cada grupo de 10 caracoles. La evaluación de la infección se hizo a la quinta semana luego de la infección de los caracoles e incubación con los organismos acuáticos. Todos los procedimientos con los animales de experimentación se siguieron tomando como referencia los principios bioéticos del Código de Bioética y Bioseguridad del Fondo Nacional de Ciencia Tecnología e Innovación (10).

Obtención de rotíferos y ciliados. Se recolectó agua de las peceras con crías de caracoles *B. glabrata* mantenidas sin reemplazo ni limpieza de las peceras por un mes. El agua recolectada se dejó sedimentar las heces y elementos

sólidos, por 1 hora en cilindros de vidrio de 5 L. Luego se recolectó el sobrenadante en tubos cónicos de 15 ml y se centrifugaron a 5000 rpm por 10 min, en centrífuga refrigerada (HERMLE, modelo Z400) y los sedimentos obtenidos fueron examinados al microscopio de luz, para visualizar y contar los rotíferos y ciliados presentes. Los sedimentos con los organismos, se resuspendieron en agua de clorada (en la proporción antes señalada) y se colocaron en peceras con caracoles *B. glabrata* de 7 a 10 mm de diámetro de concha, previamente infectados con 10 miracidios de *S. mansoni*.

Análisis de los datos. Los contajes de cercarias en caracoles infectados y co-infectados con rotíferos y *Paramecium sp.* se expresaron como el promedio \pm desviación estándar. Luego se estimó el rendimiento de la infección en los grupos co-infectados y los controles infectados en ausencia de los organismos de vida libre expresados en porcentaje.

Los datos referentes a la morfología de ciliados, rotíferos y cercarias se registraron fotográficamente en un fotomicroscopio (Nikon, Eclipse 600) equipado con una cámara (Coolpix 900) y los datos de numéricos fueron presentados a través de gráficos de barra.

RESULTADOS

Las características morfológicas de los organismos de vida libre, fueron típicas del Phylum Rotifera como es la corona, los pies de fijación, el segmento anal, el mástax y la rama caudal, descritas por otros autores (11) (Figura 1). En el caso de los organismos ciliados, las características morfológicas, presencia de vacuolas contráctiles y fagocíticas y de macronúcleo; así como la citofaringe fueron compatibles con *Paramecium sp.* (12, 13) (Figura 2).

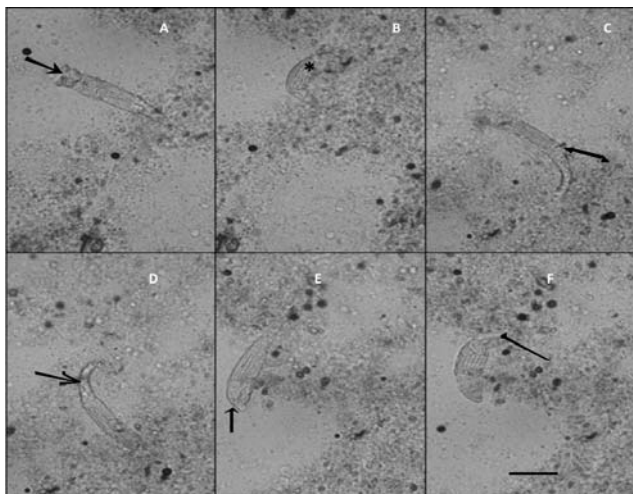


Figura 1. Organismos del Phylum Rotifera (*Philodina sp.*) de la región cefalopodal de un caracol *B. glabrata* infectado con *S. mansoni*, donde se aprecian la corona (flecha pequeña, A). El Mástax, el cual se observa en movimiento (asterisco, B). Los pies (flecha doble, C). Segmento anal (flecha grande, D). El organismo contraído (flecha plana, E). El pie, el cual se fija al tejido (flecha de rombo, F). Barra=100 μ m

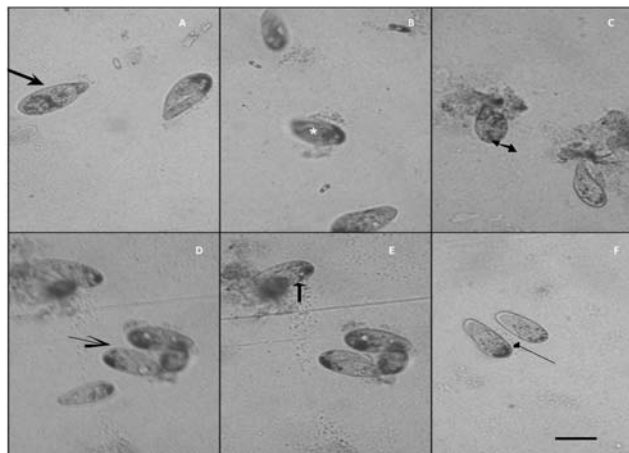


Figura 2. Organismos del Phylum Ciliophora (*Paramecium sp.*) en tejido de la región cefalopodal de un caracol *B. glabrata* infectado con *S. mansoni*, donde se aprecian: la citofaringe (A, \rightarrow), vacuola contráctil (asterisco, B), y vacuolas digestivas (flecha pequeña, A). Barra= 100 μ m.

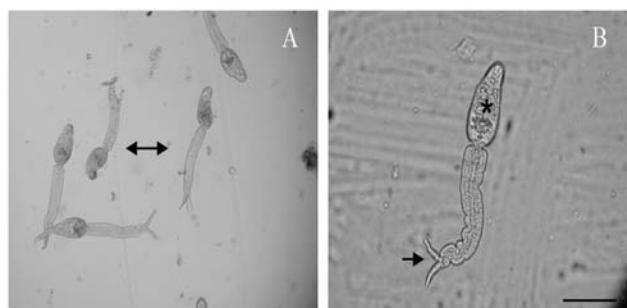


Figura 3. Cercarias de *S. mansoni* emitidas por caracoles *B. glabrata* infectados. En grupo (A, doble flecha). Detalle de la cola bifurcada (B, flecha) y cuerpo (B, asterisco). Barra= en A=250 μ m; en B=100 μ m.

Al analizar el rendimiento de la infección en cada grupo se obtuvo que en el grupo 1 de *B. glabrata* coinfestada, se obtuvo una emisión de 1500 ± 15 cercarias de *S. mansoni*. En los grupos 2 y 3, no hubo emisión de cercarias. Mientras que en el grupo 4, donde se empleó el mismo número de rotíferos y ciliados (4500), la emisión fue de 28000 ± 12 cercarias (Gráfico 1). En los grupos empleados como control de infección se obtuvo un promedio de emisión de 57600 ± 24373 cercarias.

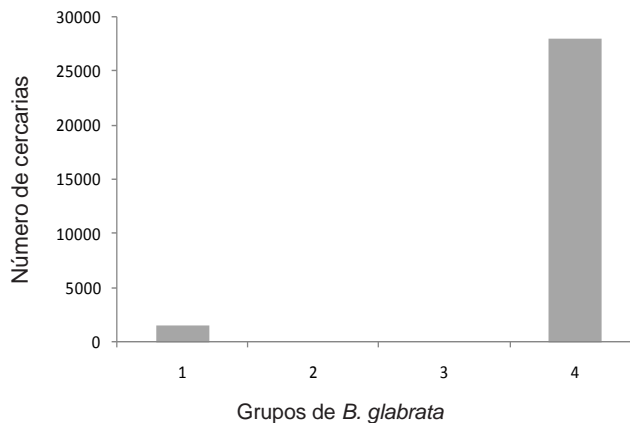


Gráfico 1. Número de cercarias emitidas en los grupos de caracoles co-infectados con ciliados y rotíferos.

Estos datos muestran que los grupos 1 y 4, la cantidad de ciliados y rotíferos empleados en el medio acuático no impidió que el parásito se multiplicara y se produjeran cercarias, no obstante, el número de cercarias emitidas fue menor a las de los grupos control. En contraste, en los grupos 2 y 3, incubados con un mayor número de rotíferos y ciliados o con un gran número de rotíferos no se observó emisión de cercarias, demostrando de forma indirecta que la inhibición de la emisión de cercarias parece estar relacionada con la presencia de gran número de rotíferos, mas que a la presencia de *Paramecium sp.*

Al calcular el porcentaje de inhibición en la emisión de las cercarias correspondiente a cada grupo de co-infección, tomando como referencia el grupo infectado sin presencia de rotíferos y *Paramecium*, se encontró que en el grupo 1 de co-infección hubo una disminución de 98,3% en la emisión de las cercarias. En los grupos 2 y 3 fue 100% y en el grupo cuatro de 63% (Gráfico 2).

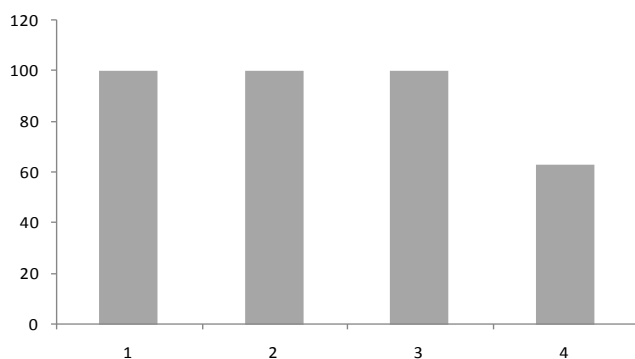


Gráfico 2. Porcentajes de inhibición en la emisión de cercarias de *Schistosoma mansoni* en grupos de caracoles *Biomphalaria glabrata* co-infectados con ciliados y rotíferos.

DISCUSIÓN

La competencia por espacios y nutrientes entre organismos es un hecho frecuente dentro de los ecosistemas, en el presente trabajo se evaluó el efecto de microorganismos acuáticos (rotíferos y *Paramecium sp.*), sobre larvas de *S. mansoni* a fin de definir si existe una relación con la disminución en la emisión de las cercarias, estadios larvarios importantes en la transmisión de la esquistosomosis al humano.

Las diferencias observadas parecen estar relacionadas con el número de rotíferos y *Paramecium* empleados, también parece indicar que la inhibición de la emisión de las cercarias se encuentra directamente relacionada con un gran número de rotíferos, como se aprecia en el grupo 3, quizás debido a que estos organismos se ubican en los tejidos del caracol, de manera que no solo compiten por los nutrientes en la pecera, además compiten por el espacio en el caracol. En relación a lo anterior, otro autor (14) refiere que los rotíferos son microorganismos que no afectan al ser humano y que son, en general, organismos inofensivos a excepción de algunas especies que representan una amenaza para otros

animales acuáticos, lo que podría explicar su efecto sobre las cercarias de *S. mansoni*. Por otra lado, el empleo tanto de los rotíferos como los ciliados como competencia con *S. mansoni* constituirían un medio un tanto eficaz como mecanismo preventivo (en lugar de utilizar molusquicidas como medida para prevenir la transmisión de *S. mansoni*) que según los autores (4) son medios regulados por leyes estrictas en cuanto a su uso indiscriminado y su alto costo. Y el éxito del control biológico empleando moluscos u otros organismos que compitan con el hospedador intermediario depende de muchos factores que hacen que sean aplicados en el campo (15, 16).

Algunos autores reseñan que los *Paramecium* son organismos quimiosensibles por lo que constituye un biosensor para ambientes contaminados con aceite, pesticidas y otros agentes, puesto que su aparato sensorial detecta gran variedad de sustancias químicas repelentes y quimioattractantes y repelentes (17). En relación a los rotíferos se demostró que la especie *B. rotundiformis* es un eslabón clave en la transferencia de energía a niveles tróficos tropicales superiores debido a la alta tasa de renovación de sus poblaciones y al impacto sobre el fitoplancton (18), lo que los hace ideal su uso en acuicultura de peces, como *Tilapia larvae* (19) y en los parámetros de producción del camarón blanco del pacífico, sin deteriorar la calidad del agua (20).

Todos los autores mencionados anteriormente parecen tener algo en común y es la demostración a través de sus estudios, de que tanto el molusco *B. glabrata* como los individuos de la especie de rotíferos y ciliados, no se ven afectados al entrar en contacto entre sí, lo que a la luz de los hallazgos encontrados en el presente trabajo indica la factibilidad de que al introducir copépodos o rotíferos en el medio acuático, se alteraría la infección por *S. mansoni*, sin alterar los organismos del ecosistema que rodean al caracol, incluso los peces. Esto abre la posibilidad en un ámbito más amplio, de reemplazar los molusquicidas por métodos menos tóxicos como mecanismo de control de la transmisión de *S. mansoni* al humano, en especial porque otros modelos de control biológico han fracasado.

En conclusión, el estudio de las características morfológicas y de locomoción de los organismos encontrados en las peceras empleadas para crías de *B. glabrata* en cautiverio en el Laboratorio, mostró que los organismos pertenecen a los Phyla Ciliophora y Rotifera. Se demostró un efecto de inhibición en la emisión de las cercarias de *S. mansoni* en presencia de rotíferos y *Paramecium sp.*, dependiente de la cantidad de organismos presentes. Un porcentaje total de inhibición en la emisión de las cercarias de *S. mansoni* se relacionó con la presencia de un gran número de rotíferos.

Finalmente, el presente trabajo constituye el primer hallazgo que demuestra que organismos de los Phyla Ciliophora y Rotifera podrían ser empleados como control biológico de la infección por *S. mansoni*.

AGRADECIMIENTOS: Este trabajo se realizó con el financiamiento del Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico de la Universidad de Carabobo a través del Proyecto grupal CDCH-UC #422-10 y de Inversión Menor CDCH-UC #00220-08

REFERENCIAS

- OMS. Esquistosomiasis 2010 Consulta: 15, Mayo, 2011. Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs115/es/index.html>.
- Alarcón de Noya B, Ruiz-Guevara R, Colmenares C, Losada S, Noya O. Low transmission áreas of schistosomiasis in Venezuela: consequences on the diagnosis, treatment, and control. Mem Inst Oswaldo Cruz 2006; 101: 29-35.
- Gryseels, Polman K, Clerinx J, Kestens L. Human schistosomiasis. Lancet 2006; 368: 1106-1118.
- King C H, Dangerfield-Cha M. The unacknowledged impact of cronic schistosomiasis. Cronic Illness 2008; 4: 67-69.
- Cruz-Reyes A, Chavarin C, Campos Arias M, Taboada J, Jimenez M. Actividad molusquicida del piquerol a aislado de Piquería Trinervia (Compositae) sobre ocho especies de caracoles pulmonados. Mem Inst Oswaldo Cruz 1989; 84: 35-40.
- Pointier J P, Noya O. El control Biológico de los moluscos hospedadores intermediarios de los esquistosomas: el ejemplo de la region del Caribe. Vitae 2001; 8 : <http://caibco.ucv.ve>.
- Coulbaly J T, N'Gbessi Y K, Knopp S, Keiser J, N'Goran E K, Utzinger J. Efficacy and safety of Praziquantel in preschool-aged children in an area co-endemic for *Schistosoma mansoni* and *S. haematobium*. PLoS Negl Trop Dis 2012; 6: e1917. doi:10.1371/journal.pntd.0001917.
- Couto F, Coelho Z P, Araújo N, Kus J, Katz N, Jannotti-Passos L, Mattos A. *Schistosoma mansoni*: a method of inducing resistance o praziquantel using infected *Biomphalaria glabrata* snails Mem Inst Oswaldo Cruz 2011; 106: 153-157.
- Barrios E E, Delgado V, Araque W, Márquez M. *Schistosoma mansoni* transformación de miracidio en su huésped natural y en cultivo. Salus 2001; 5: 10-17.
- Codigo de Bioética y Bioseguridad del FONACIT. Fondo Nacional de Ciencia y Tecnología 2002. Normas de bioética y bioseguridad para la investigación con organismos vivos, ambiente y bioterios. Disponible: <http://antoniorondonlugo.com/blog/wpcontent/uploads/2007/06/bioetica.pdf>.
- FAO. Cultivo de rotíferos. En: La producción de alimento vivo y su importancia en acuicultura. 2013. Disponible: <http://www.fao.org/docrep/field/003/ab473s/ab473s03.htm>.
- Wang Y, Yuan J, Gao X, Yang X. Stage-specific appearance of cytoplasmic microtubules around the surviving nuclei during the third prezygotic division of *Paramecium*. Zoological Res 2012; 33: E98-E103. Doi.10.3724/SP.J.1141.2012.E05-06E98.
- Romero R, Torres A. Cortical development associated with conjugation of *Paramecium*. Development 1993; 117: 1099-1112.
- Aurazo de Zumaeta M. Aspectos biológicos de la calidad del agua. 2008. Disponible en: <http://cdam.minam.gob.pe:8080/handle/123456789/109>.
- Nakamura Rapado L, De Sá Pinheiro A, Orechio P, Lopes V, Fokoue H H, Scotti M T, Vogt Marques J, Pires Ohlweiler F, Borrelly S I, Braganca Pereira C A, Kato M J, Nakano M J, Nakano E, Fumiko Yamaguchi L. Schistosomiasis control using piplartine against *Biomphalaria glabrata* at different Developmental stages. PLoS Negl Trop Dis 7: e2251. doi:10.1371/journal.pntd.0002251.
- Justo de Oliveira E, Rabinovitch L, Gomes Monnerat R, Konovaloff Jannotti Passos, Zahner V. Molecular Characterization of *Brevibacillus laterosporus* and its potencial use in biological control. Appl Environ Microbiol 2004; 70: 6657-6664.
- Giuffre C, Hinow P, Vogel R, Ahmed T, Stocker R, Consi T R, Strickler J R. The ciliate *Paramecium* shows higher motility in non-uniform chemical Landscapes. PLOS ONE 2011; 6(4): e15274. doi:10.1371/journal.pone.0015274.
- Cabrera M I. Tasa de crecimiento poblacional del rotífero *Brachionus rotundiformis* (Rotifera: Brachionidae) en un quimioestado de dos cámaras. Rev Biol Trop 2008; 56: 1149-1157.
- Prieto M, Atencio V. Zooplankton en la larvicultura de peces neotropicales. Rev MVZ Córdoba 2008; 13:1415-1425.
- Campaña-Torres A, Martínez.Córdova L R, Villareal-Colmenares H, Hernández-López J, Ezquerro-Brauer J M, Cortés-Jacinto E. Efecto de la adición de rotífero *Brachionus rotundiformis* (Tschugunoff, 1921) sobre la calidad del agua y la producción, en cultivos super-intensivos de camarón blanco del Pacífico *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931). Rev Biol Mar Oceanog 2009; 44: 335-342.



Efecto del tratamiento con praziquantel sobre la actividad de la fosfatasa alcalina, fosfatasa acida, superóxido dismutasa en extractos crudos y productos de excreción-secreción de gusanos de *Schistosoma mansoni*.

Emilia E Barrios^{1,2}, Jesús Rodríguez¹, Naim Richani¹, Wolfan Araque¹, Juan F Quintana^{1,3}, Lisset Sánchez¹

RESUMEN

Venezuela se encuentra entre los países sudamericanos afectados por la esquistosomiasis y la quimioterapia con praziquantel (PZQ) es la principal estrategia de control. Se determinó el efecto cuantitativo del tratamiento con praziquantel sobre la actividad de la Fosfatasa Alcalina (ALP), Fosfatasa Acida (ACP) y Superóxido Dismutasa (SOD), en antígenos solubles (ASG) y productos de excreción-secreción (PESG) de gusanos hembras y machos condición control (ASGHc, ASGMc, PESGHc and PESGMc) o incubados con PZQ *in vitro* (ASGMpzq, ASGHpzq, PESGMpzq and PESHPzq). Las proteínas totales se determinaron por colorimetría, la SOD y ACP mediante espectrofotometría y la ALP por fluorimetría. Se encontró una mayor concentración de proteínas en las ASG de gusanos no tratados, y en las preparaciones obtenidas luego de la incubación con PZQ *in vitro*, en los PESG, un incremento en la actividad ACP en los ASG y PESG preparados con gusanos no-tratados, y una disminución de dicha actividad en los ASG y PESG tratados. La SOD, evidenció en los ASG una disminución estadísticamente significativa en los gusanos tratados. La concentración de la ALP disminuyó significativamente en los ASG y PESGH de gusanos tratados en relación a los gusanos no tratados. En conclusión, se observó una disminución en las proteínas totales, actividades enzimáticas ACP y SOD, y concentración de ALP, en ASG y PESG obtenidos con gusanos tratados.

Palabras clave: praziquantel, enzimas, *Schistosoma mansoni*.

ABSTRACT

Effect of Treatment with Praziquantel on the activity of alkaline phosphatase acid phosphatase, superoxide dismutase in crude extracts and excretion-secretion products of *Schistosoma mansoni* worms.

Venezuela is among South American countries affected by schistosomiasis and chemotherapy with praziquantel (PZQ) is the main control strategy. We determined the quantitative effect of treatment with PZQ on alkaline phosphatase activity (ALP), acid phosphatase (ACP) and superoxide dismutase (SOD) in soluble antigens of worms (SWAP) and excretion-secretion products (EEP) of male and female worms (SMWAP_c, SFWAP_c, ESPWM_c and ESPWH_c) or incubated with PZQ *in vitro* (SMWAP_{PZQ}, SFWAP_{PZQ}, ESPWM_{PZQ} and ESPWH_{PZQ}). Total proteins were determined by colorimetry, SOD and ACP by spectrophotometry and fluorometry ALP. There was higher protein concentration in the untreated worms EG, and the preparations obtained after incubation with PZQ *in vitro*, in the EG, an increase in ACP activity in the EG and PG prepared with non-treated worms and a decrease of such activity on the EG and treated PG. On the other hand, SOD activity, the EG showed statistical significance in the treated worms. In the PG showed the same behavior, but those differences were not statistically significant. Similarly, there was a decrease in the concentration of ALP noticeable in the EG and worm PGH treated worms relative to untreated statistically significant. In conclusion, we observed a decrease in total protein, ACP and SOD enzyme activities and concentration of ALP, and EG in PG treated worms.

Keys Words: Praziquantel, enzymes, *Schistosoma mansoni*, crude extracts, excretory-secretory products.

INTRODUCCION

La Esquistosomiasis, también conocida como Bilharziasis, es una parasitosis producida por trematodos digenéticos de la familia *Schistosomatidae*, prevalentes en las regiones tropicales y subtropicales del mundo, afectando más de doscientos millones de personas (1). En América del Sur, el agente causal es *Schistosoma mansoni* y en Venezuela el área endémica comprende la región centro norte del país, con una extensión de 15 mil Km², lo que corresponde al 1,6 % del territorio nacional (1,2)

La infección en el humano ocasiona una enfermedad endémica frecuentemente de forma crónica leve, la cual se presenta de manera asintomática u oligoasintomática. En otros individuos, las lesiones ocurren en el hígado y en estas las formas graves presentan cuadros clínicos con hepato-esplenomegalia, hipertensión portal y fibrosis hepática (2).

¹ Laboratorio de Helminología del Instituto de Biología Molecular de Parásitos (Instituto BioMolP). Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad de Carabobo. Valencia, Venezuela.

² Departamento de Investigación y Desarrollo Profesional, Escuela de Bioanálisis. Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad de Carabobo. Valencia, Venezuela.

³ Centre for Infection, Immunity and Evolution, Ashworth Laboratories, University of Edinburgh, West Mains Road, Edinburgh EH9-3JT, UK.

Correspondencia: Emilia Barrios.

E-mail: barrios.emilia@gmail.com

El mecanismo de transmisión se inicia con la mala disposición de las heces con los huevos de las personas infectadas en el medio ambiente, favoreciendo la eclosión de estos y la liberación de las larvas denominadas miracidios. Éstas infectan al caracol hospedador intermediario, *Biomphalaria glabrata*, en el cual la multiplicación y transformación del parásito da origen a las cercarias, las cuales abandonan al molusco e infectan a su hospedador definitivo (el hombre o mamíferos roedores), a través de la piel, transformándose en esquistosómulo. En el sistema porta hepático los gusanos adultos diferenciados sexualmente se aparean y la hembra en el canal ginecóforo del macho se traslada a los plexos hemorroidales intestinales y deposita los huevos (2).

Los adultos del *S. mansoni* alargados, cilíndricos y curvos hacia la parte posterior, miden entre 1 y 2 cm de longitud. El macho posee una apertura longitudinal llamada canal ginecóforo, el cual aloja a la hembra. Externamente el parásito se encuentra recubierto por capas de células multinucleadas formando un sincitio, denominado tegumento. Durante la transformación de cercarias a esquistosómulo, la superficie externa del tegumento se modifica desde una capa celular única que contiene un glucocalix, a una membrana doble.

Las proteínas encontradas en el exterior de la doble membrana, entre ellas enzimas como la Fosfatasa Alcalina (ALP) y la Fosfatasa Ácida (ACP) permiten absorber moléculas encontradas en la circulación sanguínea del hospedador definitivo y además son específicamente reconocidas por los anticuerpos de humanos y animales infectados, siendo de utilidad para diagnóstico y confirmación de la infección en zonas de baja transmisión, donde la sensibilidad de la mayoría de las pruebas conocidas tiende a disminuir debido a la baja carga parasitaria infectante (3).

El tubo digestivo incompleto de estos gusanos, determina que se alimenten, excreten sus desechos y secreten productos metabólicos a través de un orificio único. Enzimas relacionadas con mecanismos de inmunoevasión de la respuesta inmune del hospedador, como la Superóxido Dismutasa (SOD), y por tanto, una molécula con potencial utilidad en vacunación, forman parte de los productos de excreción-secreción (4-6).

El PZQ (2-(ciclohexilcarbonil)-1,2,3,6,7,11b-hexahidro-4H-pirazino (2,1-alfa) isoquinolin-4-uno) es un derivado de la pirazinoisoquinolina, empleado en el tratamiento de la esquistosomiasis y ensayos in vitro muestran que el PZQ produce contracción muscular o parálisis y daño, debido a cambios en el flujo del calcio en la membrana tegumental externa, aumentando la permeabilidad.

El PZQ interfiere con el transporte de iones inorgánicos puesto que la parálisis ocasionada en el gusano adulto se acompaña un aumento en el influjo de calcio y disminución del influjo de sodio y potasio. Adicionalmente, el tegumento del gusano es dañado y en consecuencia se exponen nuevos antígenos en la superficie del parásito (7, 8).

Además el PZQ produce cambios en los hidratos de carbono, proteínas, metabolismo de los nucleótidos; y en la actividad de enzimas parasitarias como la SOD, ACP y ALP (9). La preparación comercial es una mezcla compuesta por partes iguales de isómeros levógiros y dextrógiros, de los cuales, solo los primeros tienen actividad biológica in vivo e in vitro (10). Se absorbe vía oral y es hidroxilado a nivel hepático, el t_{max} es de 1 hora y la sobrevida plasmática de 0,8 a 1,2 horas (11). El mecanismo preciso de acción del PZQ no se ha identificado, algunos autores sugieren que el PZQ interfiere con el transporte de iones inorgánicos y que la rapidez con la que daña el tegumento del parásito, se relaciona con alteración en la homeostasis del calcio (12), específicamente a nivel de canales de calcio (13). Otros autores demostraron que la acumulación de calcio no es el único factor que determina los efectos del PZQ en gusanos, al parecer la alteración de la fluidez en la membrana tegumental (14) y la reducción de las concentraciones de glutatión, permite que la respuesta inmune del hospedador contribuya en la eliminación del gusano, y la unión a la actina de los esquistosomas ocasiona la interrupción en el tegumento o la inhibición de la captación de nucleósidos (15). De 726 genes inducidos en gusanos adultos expuestos a 50 μg de PZQ/ml por hasta 4 h y analizados por ensayos de microarreglos, 347 disminuyeron abundantemente, 131 fueron expresados con éxito y dos de las categorías más importantes de las moléculas identificadas 40% correspondieron a genes asociados a adhesión y 27 % procesos celulares. Curiosamente entre los grupos de genes inducidos en respuesta al tratamiento con PZQ, 4% correspondieron a actividad antioxidante, entre ellos a un precursor de la superóxido dismutasa extracelular (8),

La concentración de PZQ requerida para matar los esquistosomas adultos in vitro es más alta que la máxima concentración plasmática alcanzada en humanos. Se estimó que la concentración en plasma es de 0,3 $\mu\text{g}/\text{ml}$, luego de 2 horas de la administración oral de 46 mg de PZQ/Kg de peso. Mientras para producir el mismo efecto in vitro es 0,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ pero el gusano debe exponerse toda la noche al fármaco (16).

Resultados obtenidos por nuestro grupo de investigación demuestran que la actividad ALP no es modificada por el tratamiento con praziquantel y la actividad SOD se alteró en antígenos solubles, mas no en productos de excreción del gusano, a consecuencia del tratamiento (17). No obstante, dicho estudio evaluó cualitativamente la presencia de esta actividad, lo que sugiere que pequeñas fluctuaciones pudieron no ser detectadas. Por lo tanto, es de interés realizar estudios o evaluaciones cuantitativas sobre las enzimas SOD, ALP y ACP en Productos de Excreción-Secreción (PES) y Extractos Crudos del Gusano (ECG) de *S. mansoni* que permitan establecer alteraciones en la actividad de estas por su papel clave en el metabolismo del parásito. En este sentido, se determinó el efecto cuantitativo del tratamiento con PZQ, sobre la actividad ALP, ACP, SOD en extractos crudos y productos de excreción de gusanos adultos de *S. mansoni*.

MATERIAL Y MÉTODOS

Obtención de los estadios de *S. mansoni*. En esta investigación se empleó el aislado Puerto Rico de *S. mansoni*, mantenido viable por pases sucesivos entre *B. glabrata* y hámsters dorados (*Mesocricetus auratus*), en el Laboratorio de Helmintos del Instituto BioMolP. Los hámsters con 7 semanas de infección con 1000 cercarias de *S. mansoni*, fueron perfundidos y los gusanos recogidos de la vena porta hepática (18, 19) se conservaron en medio RPMI1640 pH 7.

Gusanos adultos de *S. mansoni*. En el estudio experimental se emplearon gusanos hembras y machos ($n=1 \times 10^5$), obtenidos del ciclo de mantenimiento de *S. mansoni* los cuales se utilizaron en la preparación de los Productos de Excreción-Secreción de gusanos (PESG), hembras (PESGH) y machos (PESGM) producidos por el gusano in vitro y en los Extractos Crudos de Gusanos o antígenos solubles de gusanos (ASG), hembras (ASGH) y machos (ASGM).

Tratamiento de ratones con PZQ. A ratones NRMI jóvenes machos se les administró una dosis de PZQ de 40 mg/kg de peso, vía intragástrica, se esperó 1 hora y 30 min para la metabolización de la droga en el ratón. Posteriormente se extrajo la sangre mediante punción cardíaca. Se retrajo el coágulo a 37 °C por 10 minutos y se centrifugó a 2500 rpm por 10 minutos, para separar el suero con el metabolito activo del PZQ.

Producción de antígenos solubles y productos de excreción-secreción. Los gusanos machos y hembras ($n=1000$), obtenidos del ciclo de mantenimiento de *S. mansoni* fueron colocados en un medio comercial RPMI1640 pH 7 en frío. En la condición con el PZQ, los gusanos machos y hembras se incubaron una hora a 37 °C en el suero con el metabolito activo de la droga y se lavaron tres veces con medio. En la condición control, se sustituyó el suero con RPMI1640 y ambas condiciones se incubaron en medio, dos horas a 37 °C con agitación. Luego se centrifugó por 30 minutos a 14000 rpm a 4 °C. Los sobrenadantes o Productos de Excreción-Secreción de Gusanos (PESG) obtenidos de las hembras y machos incubados en ausencia de la droga, PESGMc y PESGHc y en presencia de esta, PESGMpzq y PESGHpzq (20).

Los gusanos incubados y centrifugados fueron macerados con un homogenizador de tejidos de teflón. El homogenato obtenido se centrifugó a 14000 rpm por dos horas a 4 °C y los sobrenadantes o antígenos solubles de gusanos (ASG) de hembras y machos incubados en RPMI1640 (ASGMc y ASGHc) e incubados en RPMI1640 con PZQ (ASGMpzq y ASGHpzq). Los ASG y PESG fueron recolectados, se dializaron contra agua durante 12 h a 4 °C y fueron guardados a -20 °C hasta su uso, dentro de la misma semana de obtención (21) y previa determinación enzimática se les hizo la de proteínas totales, empleando el método de Bradford modificado por Spector (22).

Determinación de las enzimas. En la determinación de la superóxido dismutasa (SOD), se empleó un método de detección indirecta, basado en el método de reducción del anión superóxido, el cual guarda una relación directa con la xantina oxidasa e inversamente proporcional a la SOD, con el kit para superóxido dismutasa de Calbiochem (USA) siguiendo instrucciones del fabricante. La lectura de la actividad de la reacción fue medida a partir de una curva construida con patrones de actividad SOD (0,025; 0,05; 0,1; 0,15; 0,2; 0,25 UI/ml). A los patrones y muestras se les adicionó la sal de tetrazolio y se inició la reacción enzimática con la adición de Xantina oxidasa, seguida de incubación 20 min a temperatura ambiente y lectura a 450 nm (23).

En la determinación de la actividad Fosfatasa Acida (ACP) se empleó como sustrato 4-nitrofenil fosfato en medio ácido y una solución estándar de p-nitrofenol (10 mM), en medio alcalino (SIGMA, USA). Para la determinación los PESG y ASG fueron diluidos 1:2 con agua destilada, y se incubaron por 30 minutos a 37 °C con solución sustrato y se leyó la absorbancia a 405 nm en el lector de Elisa, y se calculó la actividad con la siguiente fórmula:

$$U/mL = \frac{[A \text{ [muestra]} - A \text{ [blanco]}] \times 0.05 \times 0.3 \times FD}{A \text{ [estándar]} \times \text{tiempo} \times V \text{ enz}}$$

A[muestra]: absorbancia de la muestra; A[blanco]: absorbancia del blanco; 0,05: concentración de 4-nitrofenol en solución estándar; 0,3: 0.3 mL, el volumen total del ensayo en la placa de 96 pozos, incluyendo la solución Stop; FD: factor de dilución de la muestra estándar; A del [estándar]: absorbancia del estándar; Tiempo: tiempo de incubación a 37 °C en minutos; V enz: volumen de la muestra enzimática añadida al ensayo en mL.

En la evaluación de la fosfatasa alcalina (ALP) se preparó una solución sustrato de 4-metil-lumbeliferil-fosfato (10mM) en H₂O desionizada (SIGMA, USA), y se incubó con los PESG y ASG o control enzimático (100 µg/ml), por 15 minutos a 37 °C y se leyó la reacción fluorimétrica con un filtro de absorción de 360 nm y de emisión de 440 nm en el fluorímetro.

Análisis de los datos. Los datos cuantitativos de las determinaciones enzimáticas, se expresaron como el promedio \pm desviación estándar.

La comparación de las determinaciones en hembras y machos pre y post-incubación con PZQ se realizó mediante una prueba T de Student, y valores de p menores a 0,05 se consideraron estadísticamente significativos. En el análisis estadístico se empleó el programa STATISTIC versión 9.

RESULTADOS

La determinación de proteínas totales de PESG y ASG, reveló una mayor concentración de proteínas en las preparaciones provenientes de gusanos no tratados en los ASGMc y ASGMc, y en las preparaciones obtenidas luego de la incubación con PZQ in vitro, en los ASGMpzq y ASGHPZQ (Tabla 1).

Tabla 1. Concentración de proteínas totales en ASG y PESG en 1000 gusanos hembras o machos, expresados como el promedio \pm desviación estándar.

Tipo de preparación	Concentración de proteínas ($\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$) X \pm DS
ASGM _c	1831,6 \pm 916,2
ASGM _{pzq}	1596,9 \pm 861,1
ASGH _c	542 \pm 203,8
ASGH _{pzq}	508,8 \pm 388,1
PESGM _c	371,6 \pm 272,8
PESGM _{pzq}	1908,8 \pm 422,8
PESGH _c	199 \pm 45,4
PESGH _{pzq}	2183,2 \pm 1566,3

Al evaluar la actividad enzimática de la ACP en los ASG y PESG se encontró un incremento en los ASG y PESG preparados con gusanos no-tratados, y una disminución de dicha actividad en los ASG y PESG tratados (Tabla 2), observándose diferencias estadísticamente significativas en los ASG preparados con gusanos tratados y no tratados, mientras que en los PESG tales diferencias no son significativas.

Tabla 2. Actividad ACP en los ASG y PESG adultos machos y hembras, antes y después del tratamiento con PZQ.

Tipo de preparación	Actividad (UI. mL^{-1})		
	Media	Desviación estándar	P
ASGM _c	0,00032	0,00065	1x10 ⁻¹⁰
ASGM _{pzq}	0,00003	0,00000	
ASGH _c	0,00002	0,00001	2,80x10 ⁻⁴
ASGH _{pzq}	0,00003	0,00000	
PESGM _c	0,00663	0,00765	4,42x10 ⁻¹
PESGM _{pzq}	0,00490	0,00506	
PESGH _c	0,00202	0,00109	7,33x10 ⁻¹
PESGH _{pzq}	0,00176	0,00131	

P<0,05 es significativa.

El análisis de las actividades enzimáticas para la SOD, mostró en los ASG una disminución estadísticamente significativamente en los gusanos tratados. En los PESG se observó el mismo comportamiento, pero dichos resultados no fueron estadísticamente significativos (Tabla 3).

Tabla 3. Actividad SOD en los ASG y PESG adultos machos y hembras, antes y después del tratamiento con PZQ.

Tipo de preparación	Actividad (UI. mL^{-1})		
	Media	Desviación estándar	P
ASGM _c	0,28320	0,20699	8x10 ⁻⁶
ASGM _{pzq}	0,44160	0,00695	
ASGH _c	0,29160	0,02142	6,6x10 ⁻⁴
ASGH _{pzq}	0,45220	0,02208	
PESGM _c	0,19000	0,02113	9,41x10 ⁻¹
PESGM _{pzq}	0,16220	0,02031	
PESGH _c	0,14760	0,08981	2,06x10 ⁻²
PESGH _{pzq}	0,14100	0,02263	

P<0,05 es significativa.

En conjunto con la ACP y la SOD se evaluó la actividad enzimática de la ALP donde se evidenció la disminución notable de la actividad enzimática en los ASG Y PESH de gusanos tratados en relación a los gusanos no tratados, (tabla 4) obteniendo datos estadísticamente significativos que demuestran que la acción farmacológica empleada es efectiva. En los PESGM se evidencia el incremento de la actividad enzimática en los gusanos tratados, pero los datos no son estadísticamente significativos.

Tabla 4. Concentración de ALP en los ASG y PESG adultos machos y hembras, antes y después del tratamiento con PZQ.

Tipo de preparación	Concentración ($\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$)		
	Media	Desviación estándar	P
ASGM _c	1,09829	0,04307	5,30x10 ⁻⁵
ASGM _{pzq}	0,96957	0,36276	
ASGH _c	0,78629	0,16078	2,58x10 ⁻²
ASGH _{pzq}	0,52300	0,44442	
PESGM _c	0,10700	0,22657	6,17x10 ⁻¹
PESGM _{pzq}	0,12457	0,28040	
PESGH _c	1,68128	0,43168	1x10 ⁻⁶
PESGH _{pzq}	0,11371	0,02520	

P<0,05 es significativa.

DISCUSIÓN

Los extractos crudos y productos de excreción-secreción de *S. mansoni*, se caracterizan por su gran contenido enzimático, relacionado con mecanismos de inmunoevasión de la respuesta inmune y antigenicidad. El presente estudio determinó el efecto del tratamiento con PZQ sobre enzimas del parásito presentes en ambas preparaciones.

Al inicio del estudio se determinaron las proteínas totales de PG y EG, encontrándose una mayor concentración de proteínas en las preparaciones provenientes de gusanos no tratados en los EG, y en las preparaciones obtenidas luego de la incubación con PZQ in vitro, en los PG (Tabla 1).

El efecto del tratamiento sobre las proteínas totales en los extractos crudos del parásito se relacionan con estudios recientes que demuestran el papel de las P- glicoproteínas (SMDR2) y las proteínas asociadas a multiresistencia a drogas (MRP1) que se encuentran en el sistema excretor del gusano de *Schistosoma mansoni*, asociadas a resistencia a fármacos, puesto que la expresión de estas proteínas se altera en los gusanos expuestos a praziquantel (PZQ), y se expresa en niveles más altos en los gusanos de las cepas con susceptibilidad reducida al fármaco (24). Además, el tratamiento pudiera afectar genes como el Gen MEG que en *S. mansoni* induce la variación en las proteínas secretadas por el tegumento, relacionadas a la interacción inmune con el hospedador (25). En consecuencia, los hallazgos encontrados en el presente estudio pueden tener implicaciones no solo a nivel de tratamiento

quimioterapéutico, además pueden estar relacionados con eventos de interacción con el sistema inmune del hospedador.

Todas las enzimas lisosomales como la ACP son activadas en condiciones específicas por el catabolismo creciente del tejido fino, por lo tanto, el aumento de la fosfatasa ácida está relacionada con el aumento en el catabolismo de los tejidos (26), como resultado del aumento de los productos del metabolismo del gusano *S. mansoni* por tanto, la disminución de la ACP en ASG y PESG observada en nuestro estudio, indican indirectamente que el PZQ altera este metabolismo enzimático, ocasionando una disminución del metabolismo del parásito que afecta la producción y secreción-excreción de esta enzima. En relación a las isoenzimas de la ACP se conoce que su actividad es afectada por diferentes agentes como el mercurio (bovino y porcino) y herbicidas (plantas) (27,28), constituyendo importantes flancos de control de plantas que compiten con los cultivos de interés alimenticio.

Desde el enfoque del presente estudio, la disminución de la ACP constituye uno de los elementos claves mediante los cuales, el PZQ afecta la capacidad del parásito de contrarrestar la respuesta celular y humoral del hospedador, alterando la hidrólisis de fosfomonoésteres y liberación de fosfato inorgánico del parásito (29), un mecanismo altamente relacionado con el influjo de Ca^{+2} en respuesta a la despolarización de la membrana tegumental y por ende la contracción muscular, la secreción, y la expresión genética (29).

El análisis de las actividades enzimáticas para la SOD, mostró en los ASG una disminución estadísticamente significativamente en los gusanos tratados. Un efecto similar en menor magnitud se observa en los PESG, y demuestra que uno de los efectos del tratamiento con PZQ, posiblemente relacionado con su efectividad, consiste en la disminución de enzimas claves para la defensa del parásito contra radicales tóxicos que producen las células del sistema inmune, lo que sugiere que al evaluar el uso de enzimas antioxidantes como la SOD en diseños de vacunas o terapia inmune en los pacientes infectados debe tomarse en cuenta el estatus en cuanto a tratamiento del paciente, puesto que en individuos recientemente tratados, puede no tener la misma efectividad el empleo de vacunas elaboradas con ADN codificante para la SOD, con la finalidad de estimular la producción de anticuerpos capaces de reducir de manera constante la carga parasitaria del *S. mansoni*, disminuyendo la infección existente (30). No obstante, otras alternativas tales como la sustitución de la Leu132 y la Val135 en la Superóxido Dismutasa Citosólica del parásito (SmCtSOD), postuladas para inducir cambios en la conformación, distribución de las cargas electrostáticas y la disminución de la protección del parásito pudieran ser de mayor utilidad como herramienta inmunoterapéutica, en pacientes con historia de reinfecciones postratamiento (31). Por otra parte, estos resultados coinciden con estudios realizados *in vivo*, en los cuales se demuestra que el tratamiento combinado de PZQ y pentoxifilina producen disminución en los niveles

séricos de citoquinas pro-fibróticas (TGF- β y TNF- α) y de las enzimas hepáticas antioxidantes, glutatión peroxidasa, glutatión-S-transferasa, glutatión reductasa y SOD (32)

En cuanto a la actividad enzimática de la ALP se observa la disminución notable de la actividad enzimática en los ASG y PESG, particularmente significativo en los PESGH, hallazgos de fundamental interés puesto que durante la infección por *S. mansoni* ocurre un aumento en la excreción de la ALP como producto del catabolismo del parásito, lo que se refleja en la persona infectada con un aumento de la enzima en sistema porta venoso hepático, y constituye un elemento estimulador de la respuesta inmune del hospedador, por lo cual la ALP es considerada altamente inmunógena y es empleada como antígeno en el diagnóstico serológico (33).

Además, recientemente se demostró que la ALP se ubica en la capa externa tegumental de *S. mansoni*, y que mediante mecanismo que generan adenosina, el parásito es capaz de modular la respuesta inmunitaria del hospedador contra el, como demuestran estudios en los cuales al suprimir el ARN de la ALP disminuye la producción de adenosina, y la capacidad del parásito para evadir la respuesta inmunitaria del hospedador (34). Ambos estudios reflejan la importancia de esta enzima de *S. mansoni* para la supervivencia y como marcador diagnóstico, resaltando que cualquier estrategia quimioterapéutica, inmunoterapéutica o de vacunación debe medir el efecto sobre esta enzima.

Similarmente, estudios previos de nuestro grupo de investigación lograron definir a nivel cualitativo el efecto del PZQ sobre la actividad enzimática SOD, ALP y ACP (17) de PESG y PESG, así como la utilidad potencial en el inmunodiagnóstico de antígenos preparados con gusanos y huevos de *S. mansoni* incubados *in vitro* con PZQ (35). En este sentido, los hallazgos del presente estudio contribuyen a definir y comparar en términos cuantitativos el efecto del PZQ sobre enzimas tegumentales y de excreción-secreción, faltaría por caracterizar y definir la contribución que esto tiene sobre la expresión o inhibición de antígenos que puedan favorecer el diagnóstico, permitan evaluar la efectividad del tratamiento en los pacientes infectados y definir posibles variantes enzimáticas relacionadas con la resistencia antihelmíntica descritas en otros metazoarios (36), en *S. mansoni*.

No obstante, los hallazgos del presente contribuyen a comprender los efectos positivos del praziquantel sobre la patogenia de la enfermedad, puesto que las enzimas contribuyen en la evasión de la respuesta inmune y en la estimulación del sistema inmune del hospedador, lo que contribuye en exacerbar la inflamación y consecuentes secuelas. Además reviste importancia porque estas enzimas se encuentran asociadas al tegumento y este se considera un potencial blanco para el desarrollo de vacunas anti-esquistosoma, puesto que se ha logrado reducir el número de huevos en el hígado, la eliminación de huevos en las heces, número de granulomas hepáticos y adultos empleando

antígenos tegumentales del estadio esquistosómico (37), por lo que una combinación de quimioterapia con inmunoterapia podría aumentar la protección contra la esquistosomiasis, en el humano.

En conclusión, en el presente estudio se encontró una disminución en las proteínas totales, actividades enzimáticas ACP y SOD y la concentración de la ALP de extractos crudos y productos de excreción de *S. mansoni* preparados con gusanos tratados con PZQ *in vitro*, particularmente significativos en los PESGM postratamiento para la ACP, en los ASG para la SOD y en ASG y PESGH para la ALP.

AGRADECIMIENTO. Los autores agradecen el apoyo técnico a las Asistentes de investigación, Olga Ojeda y Jennifer Ayala.

FINANCIAMIENTO. El trabajo fue financiado por los Proyectos de Investigación CDCH-UC N° 00220-08 y CDCHUC N° 2010-004.

REFERENCIAS

- Gryseels B. Schistosomiasis. *Infect Dis Clin North Am.* 2012 Jun;26(2):383-97.
- King CH, Dangerfield-Cha M. The unacknowledged impact of chronic schistosomiasis. *Chronic Illness* 2008; 4: 65-79
- Ash LR, Orihel TC. Quinta edición. Madrid, España: Panamericana, 2010.
- Cesari I, Ballen D, Mendoza L, Matos C. Detection of *Schistosoma mansoni* membrane antigens by immunoblot analysis of sera of patients from low-transmission areas. *Clin Diagn Lab Immunol* 2005; 12(2): 280-286.
- Botero D, Retrepo M, Rodrigo A, Parra G. *Parasitosis Humanas* (4ta edición) Medellín: Colombia, 2005.
- Tran M, Freitas T, Cooper L, Gase S, Gattón M, Jones M, Lovas E, Pearce EJ, Loukas A. Suppression of mRNAs encoding tegument tetraspanins from *Schistosoma mansoni* results in impaired tegument turnover. *PLoS Pathogens* 2010; 6(4):1-10.
- Carvalho C, Cook R, Wang C, Oliveira R, Bailey N, Egilmez N, Mathiowitz E, Philip T. Cross-reactivity of *Schistosoma mansoni* cytosolic superoxide dismutase, a protective vaccine candidate, with host superoxide dismutase and identification of parasite-specific B epitopes. *Infect Immun* 2004; 72(5):2635-2647.
- Pica-Mattoccia L, Cioli D. Sex- and stage-related sensitivity of *Schistosoma mansoni* to *in vivo* and *in vitro* praziquantel treatment. *Int J Parasitol* 2004; 34: 527-533.
- Aragon AD, Imani T, Am Blackburn VE, Cupit PM, Melman SD, Goronga T, Webb T, Loker E, Cunningham C. Towards an understanding of the mechanism of action of praziquantel. *Mol Biochem Parasitol* 1988; 29:55-9.
- Doenhoff MJ, Cioli D, Utzinger J. Praziquantel: mechanisms of action, resistance and new derivatives for schistosomiasis. *Curr Opin Infect Dis* 2008; 21: 659-667.
- Manual Merck. Praziquantel. Consulta: 12/02/2012. Disp en: <http://www.merckmanuals.com/professional/lexicomp/praziquantel.html>.
- Caffrey CR. Chemotherapy of schistosomiasis: present and future. *Current Opinion in Chemical Biology* 2007; 11: 433-439.
- Harder A, Goossens J, Andrews P. Influence of praziquantel and Ca²⁺ on the bilayer-isotropic-hexagonal transition of model membranes. *Mol Biochem Parasitol* 1988;29:55-9.
- Lima SF, Vieira LQ, Harder A, Kusel JR. Effects of culture and praziquantel on membrane fluidity parameters of adult *Schistosoma mansoni*. *Parasitology* 1994;109:57-64.
- Ribeiro F, Coelho PM, Vieira LQ, Watson DG, Kusel JR. The effect of praziquantel treatment on glutathione concentration in *Schistosoma mansoni*. *Parasitology*. 1998;116:229-36.
- Andrews PA. A summary of the efficacy of praziquantel against schistosomes in animal experiments and notes on its mode of action. *Arzneimittel-Forschung* 1981; 31: 530-41.
- Barreto O, Blanco R, Barrios EE, Sánchez L, Araque W, Delgado V, Pinto V. Efecto *in vitro* del praziquantel sobre la actividad enzimática de superóxido dismutasa, fosfatasa ácida y fosfatasa alcalina en gusanos adultos de *Schistosoma mansoni*. *Memorias VII Congreso de Investigación y 1er Congreso Internacional de la Universidad de Carabobo* 2010. Tomo III: 2007-2010.
- Araque W, Barrios E, Rodríguez P, Delgado V, Finol H. Ultrastructural study of the *in vitro* interaction between *Biomphalaria glabrata* hemocytes and *Schistosoma mansoni* miracidia. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2003; 98, 905-908.
- Barrios E, Finol H, Delgado V, Araque W. *Schistosoma mansoni*: Cambios ultraestructurales durante la transformación del miracidio *in vitro*. *Salus* 2004; 8, 12-19.
- Abdulla M-H, Lim K-C, McKerrow JH, Caffrey CR. Proteomic Identification of IPSE/alpha-1 as a Major Hepatotoxin Secreted by *Schistosoma mansoni* Eggs. *PLoS Negl Trop Dis* 2011; 5(10): e1368. doi:10.1371/journal.pntd.0001368.
- Ramajo Hernández A. Análisis de los proteomas y glicoproteomas del tegumento y de los productos de excreción-secreción de *Schistosoma bovis*. Estudio de la interacción del parásito con el sistema fibrinolítico del hospedador. Tesis Doctoral. Universidad de Salamanca, Salamanca: España. 2008.
- Spector T. Refinement of the coomassie blue method of protein quantitation. *Anal Biochem* 1981; 86:142-146.
- Lee S, Moon S-O, Kim W, Sung MJ, Kim DH, Kang KP, Jang YB, Lee JE. Protective role of L-2-oxothiazolidine-4-carboxylic acid in cisplatin-induced renal injury. *Nephrol Dial Transplant* 2006; 21: 2085-2095.
- Kasinathan RS, Morgan WM, Greenberg RM. *Schistosoma mansoni* express higher levels of multidrug resistance-associated protein 1 (SmMRP1) in juvenile worms and in response to praziquantel. *Mol Biochem Parasitol* 2011; 173(1): 25-31.

25. DeMarco R, Mathieson W, Manuel SJ, Dillon PG, Curwen RS, Ashton PD, Ivens AC, Berriman M, Almeida SV, Wilson RA. Protein variation in blood-dwelling schistosome worms generated by differential splicing of micro-exon gene transcripts. *Genome Res* 2010; 20:1112–112.
26. Hamed MA. Potency of detergents in enhancing *Schistosoma mansoni* tegumental antigens. *J Infect Dev Ctries* 2011; 5(3):209-215.
27. Guija E, Soberón M, Haak-Mares H. Mecanismo de acción de las fosfatasa ácidas de bajo peso molecular. *An Fac Med Lima* 2007; 68(4): 356-362.
28. Alvear M, López R, Rosas A, Espinoza N. Efecto de la Aplicación de Herbicidas en Condiciones de Campo Sobre Algunas Actividades Biológicas. *Rev Cienc Suelo Nutr Veg* 2006; 6(1): 64-76.
29. Suh B-C, Leal K, Hille B. Modulation of high-voltage activated Ca²⁺ channels by membrana phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. *Neuron* 2010; 62(2): 224-238.
30. Cook RM, Carvalho-Queiroz C, Wilding G, LoVerde PT. Nucleic Acid Vaccination with *Schistosoma mansoni* Antioxidant Enzyme Cytosolic Superoxide Dismutase and the Structural Protein Filamin Confers Protection against the Adult Worm Stage. *Infect Immun* 2004, p. 6112–6124.
31. Cardoso RM, Silva CH, Ulian de Araújo AP, Tanaka T, Tanaka M, Garratt RC. Structure of the cytosolic Cu,Zn superoxide dismutase from *Schistosoma mansoni*. *Acta Cryst* 2004; 60(9). 1569-1578.
32. El-Lakkany N, Seif el-Din S, Ebeid F. The use of pentoxifylline as adjuvant therapy with praziquantel downregulates profibrogenic cytokines, collagen deposition and oxidative stress in experimental *schistosomiasis mansoni*. *Exp Parasitol* 2011; 129(2): 152-157.
33. Cesari IM, Ballen DE, Mendoza L, Matos C. Detection of *Schistosoma mansoni* membrane antigens by immunoblot analysis of sera of patients from low-transmission areas. *Clin Vaccine Immunol* 2005; 12: 280-286.
34. Bhardwaj R, Skelly PJ. Characterization of *schistosome tegumental* alkaline phosphatase (SmAP). *PLOS Negl Trop Dis* 2011. [citado: 2011 Septiembre 25]. Disponible en: e1011. doi:10.1371. journal.pntd.0001011.
35. Barrios EE, Delgado V, Araque W, Pinto V, Ojeda O, Ayala J. Respuesta humoral murina y humana contra antígenos solubles de huevo y excreción-secreción de gusanos de *Schistosoma mansoni*, tratados con praziquantel. *Revista Ibero-Latinoam de Parasitol* 2010 69(2): 178-185.
36. Miranda-Miranda E, Llébano-Hernández E, López-Arellano M E, Mendoza de Gives P, Cossio-Bayugar R. Marcadores enzimáticos como indicadores de resistencia a los antihelmínticos en el nematodo parásito gastroentérico de ruminantes *Haemonchus contortus*. *Bioquímica* 2006; 31:6-12.
37. Martins V P, Pinheiro C S, Figueiredo C P, Assis N R, Morais S B, Caliani M V, Azevedo V, Castro-Borges W, Wilson A, Oliveira SC. Vaccination with enzymatically cleaved GPI-Anchored protein from *Schistosoma mansoni* induces protection against challenge infection. *Clin Dev Immunol* 2012. Doi: 10.1155/2012/962538.



Relación entre cambios en la expresión de proteasas y metacicloogénesis espontánea asociadas a las condiciones de mantenimiento de *Trypanosoma cruzi* en el laboratorio.

Yhol Ledezma¹, María Ledezma¹, Marlyn León¹, Wilmer Pineda¹, Rosa Arteaga¹, María C. Navarro¹, Víctor Contreras¹, Ana Rita De Lima^{1,2,*}

RESUMEN

La metacicloogénesis de *Trypanosoma cruzi* es la transformación del estadio epimastigota en tripomastigota metacíclica que ocurre en la ampolla rectal del insecto vector. Durante este proceso se ha implicado una activación del metabolismo proteico, con probable participación de proteasas en la degradación de proteínas del parásito. En el presente trabajo se determinó el efecto de las condiciones de mantenimiento de *T. cruzi* en el laboratorio sobre la actividad de proteasas y su relación sobre la metacicloogénesis espontánea en cultivos axénicos. Se trabajó con el clon Dm30L de *Trypanosoma cruzi* mantenido en el laboratorio mediante pases trimestrales chipo-ratón (condición triatomino: CT) o repiques semanales durante 15 años en medio LITB (condición cultivo: CC). En ambas condiciones, se hizo curva de crecimiento durante 30 días en medio LITB suplementado con 10, 24 y 48 mM glucosa, calculándose el porcentaje de metacíclicos espontáneos y determinación de la actividad de proteasas. En 10 mM glucosa, parásitos de la CT presentaron mayor expresión de proteasas y porcentaje de metacíclicos respecto a la CC. En la CT, el crecimiento en 48 mM glucosa redujo las variables antes mencionadas, mientras que no se evidenció actividad proteolítica ni metacicloogénesis espontánea en parásitos de la CC en altas concentraciones de glucosa. En todos los casos se evidenció mayor actividad de cisteín proteasas durante la fase estacionaria del cultivo. No se reportó actividades metaloproteasas en ninguna de las condiciones estudiadas, pero sí en el clon Dm28c utilizado como control de la expresión de este tipo de enzima. Estos resultados sugieren que la expresión de proteasas está influenciada por la constitución genética del parásito y que la CC provoca disminución de la actividad proteolítica que persisten aún en condiciones de agotamiento de carbohidratos del medio, con una concomitante reducción significativa en el porcentaje de metacíclicos espontáneos.

Palabras clave: *Trypanosoma cruzi*, proteasas, metacicloogénesis

ABSTRACT

Relationship between changes in the expression of proteases and spontaneous metacyclogenesis associated to *Trypanosoma cruzi* maintenance conditions in the laboratory.

Trypanosoma cruzi metacyclogenesis is the transformation of epimastigote stage to tripomastigote metacyclic that happens in the rectal ampulla of the insect vector. During this process it has been implicated protein metabolism activation, with proteases likely involvement in parasite protein degradation. In this study we determined the effect of *T. cruzi* keeping conditions in the laboratory on the activity of proteases and their relationship on spontaneous metacyclogenesis in axenic culture. We worked with *Trypanosoma cruzi* Dm30L clone maintained in the laboratory by quarterly passes triatomine-mouse (triatomine condition: TC) or serial culture media during 15 years in LITB medium (culture condition: CC). In both conditions, growth curve was made for 30 days in LITB medium supplemented with 10, 24 and 48 mM glucose, calculating the percentage of spontaneous metacyclics and determining proteases activity. In 10 mM glucose, TC parasites showed higher expression of proteases and metacyclic percentage relative to the CC. In TC, the growth in 48 mM glucose reduced the above variables, while no evidenced proteolytic activity nor spontaneous metacyclogenesis on CC parasites in high glucose concentrations. In all cases there was greater cysteine proteases activity during the stationary phase of the culture. Metalloprotease activity was not reported in any of the conditions studied, but it was detected in clone Dm28c used as control of expression of this type of enzyme. These results suggest that the expression of proteases is influenced by the genetic makeup of the parasite and the CC causes decrease of proteolytic activity which persists even in carbohydrate depleted conditions of the medium, with a concomitant significant reduction in the percentage of spontaneous metacyclics.

Key words: *Trypanosoma cruzi*, proteases, metacyclogenesis

INTRODUCCION

Las proteasas son enzimas que catalizan la hidrólisis de enlaces peptídicos y ejecutan un amplio espectro de reacciones biológicas, implicándose su participación en la patogénesis de enfermedades parasitarias. *Trypanosoma cruzi*, agente causal de la enfermedad de Chagas, es un parásito protozoario que presenta alternancia morfológica y completa su ciclo evolutivo en dos hospedadores: un invertebrado representado por insectos hematófagos o triatominos y un hospedador vertebrado que abarca a los mamíferos, incluyendo al hombre. Existen cuatro estadios del parásito: epimastigotas y tripomastigotas metacíclicas en el insecto vector, así como tripomastigotas sanguíneas y

¹ Laboratorio de Protozoología. Instituto de Biología Molecular de Parásitos (BioMolP). Facultad de Ciencias de la Salud. Universidad de Carabobo.

² Departamento de Morfofisiopatología. Escuela de Bioanálisis. Facultad de Ciencias de la Salud. Universidad de Carabobo

Correspondencia: Ana Rita De Lima.

E-mail: delima.anarita@gmail.com

amastigotas en el hospedador vertebrado, estos últimos de localización intracelular.

Se ha descrito la existencia de una gran variedad de enzimas proteolíticas en *T. cruzi*, siendo algunas comunes en diferentes estadios, en tanto que otras son diferencialmente reguladas. La mayoría corresponden a cisteín proteasas y presentan una alta homología entre los diferentes aislados del parásito, tales como la cruzipaína (1-4), otras presentes en epimastigotas con movilidad relativa de 30 kDa (5) y 120 kDa (6). Adicionalmente se ha detectado la presencia de metaloproteasas como una de 60 kDa presente en epimastigotas (7), una de 52 kDa común a epimastigotas y metacíclicos (3) y algunas específicas de metacíclicos, tales como una enzima de 65 kDa (3) y 116 kDa (8). Por otro lado, se han reportado varias metaloproteasas en metacíclicos que migran entre 52 y 65 kDa, los cuales muestran una alta heterogeneidad según la cepa o clon de *T. cruzi* empleado (9). También se ha reportado la aparición de una serín proteinasa de 120 kDa con pH óptimo alcalino presente en epimastigotas y metacíclicos (10) y otra de 75 kDa (11). Recientemente se identificaron dos aspartil proteasas conocidas como cruzipsina-I y cruzipsina-II (12). Además de proteasas constitutivamente expresadas por el parásito, se ha demostrado la secreción de enzimas proteolíticas tipo cisteína compatible con cruzipaína (13) y metaloproteinasas de matriz extracelular conocidas como MMP-9 (14).

Durante el crecimiento de *T. cruzi* en medios de cultivo axénico, epimastigotas de fase estacionaria muestran un perfil proteolítico más complejo con respecto a la fase exponencial, caracterizado por aparición de enzimas tipo cisteína de alto peso molecular, así como una mayor actividad de la cruzipaína (15), lo cual pudiera coincidir con la sobrevivencia del parásito durante esta etapa a expensas de un metabolismo proteolítico, con agotamiento de los carbohidratos del medio.

Se ha reportado la aparición de tripomastigotas metacíclicos durante la fase estacionaria de cultivos de epimastigotas en el laboratorio, fenómeno conocido como metacicloogénesis espontánea (16). Se ha propuesto varios factores que inducen este proceso como osmolaridad (17) y agotamiento de nutrientes en el medio (18).

Basado en la hipótesis del estrés nutricional, se ha desarrollado un medio químicamente definido que simula la orina del triatomino conocido como TAU (Triatomine Artificial Urine) suplementado con Prolina, Glutamato, Aspartato y bajas concentraciones de glucosa (TAU3AAG). En este medio se logra el proceso de diferenciación en ausencia de replicación, obteniéndose un porcentaje significativamente mayor de metacíclicos con respecto a los obtenidos en cultivos envejecidos, conociéndosele como metacicloogénesis inducida (19). Se ha demostrado la activación diferencial de proteasas durante la metacicloogénesis en el medio TAU3AAG, así como inhibición de este proceso mediante la adición de inhibidores de proteasas (3).

Previamente demostramos que la metacicloogénesis espontánea coincide con el agotamiento de la glucosa del medio y posterior aumento en la liberación de amoníaco al medio de cultivo (20), sugiriendo un cambio de metabolismo glicolítico a proteico en *T. cruzi*, con probable participación de enzimas proteolíticas durante este proceso. En un mismo aislado, el esquema de mantenimiento en el laboratorio también afectaba el porcentaje de metacíclicos espontáneos; el pasaje alternado de *T. cruzi* en chipo-ratón (condición triatomino) era capaz de preservar la competencia del parásito para la metacicloogénesis.

Mientras que parásitos mantenidos mediante repiques semanales por varios años consecutivos en medio LITB (condición cultivo) bloqueaba la aparición de metacíclicos espontáneos y reducía significativamente los metacíclicos inducidos en el medio TAU3AAG (21). No obstante, el cultivo de aislados de *T. cruzi* mantenidos bajo la condición cultivo en medio LITB con bajas concentraciones de glucosa, restituía la capacidad metacicloogénizante del parásito, incrementando el porcentaje de metacíclicos tanto espontáneos como inducidos (20). Esto pudiera sugerir que la capacidad metacicloogénizante del parásito está asociada a la utilización de proteínas como fuente de energía.

En apoyo a esta idea, se ha demostrado la existencia en el epimastigota de organelas denominadas reservosomas, y que éstas desaparecen durante la metacicloogénesis, con utilización de proteínas almacenadas a este nivel (22), con probable participación de proteasas en la escisión de esas proteínas para generar aminoácidos que ingresen al ciclo de Krebs.

En este artículo se demuestra cambios en la expresión de proteasas asociadas a los niveles de glucosa y a las condiciones de mantenimiento del parásito en el laboratorio, con una posible participación de estas enzimas en la metacicloogénesis espontánea de *Trypanosoma cruzi*.

MATERIALES Y METODOS

Parásitos, condiciones de mantenimiento y curva de crecimiento. Se utilizó el clon Dm30L de *Trypanosoma cruzi* aislado de rabipelado, mantenido mediante pasajes alternos triatomino-ratón (condición triatomino) o mediante repiques semanales durante 15 años consecutivos en medio axénico (LITB) a 27° C (condición cultivo) (21). Los parásitos fueron cultivados en medio LITB (23). Para la determinación de la curva de crecimiento, los parásitos fueron cultivados en frascos Erlenmeyer de 125 mL partiendo de un inóculo inicial de 2×10^6 parásitos/mL en un volumen final de 20 mL de medio de cultivo en presencia de 10, 24 y 48 mM glucosa.

Los diferentes puntos de la curva se realizaron por triplicado. Se realizó el conteo de los parásitos en cámara de Neubauer y se calculó el porcentaje de tripomastigotas metacíclicos en láminas fijadas coloreadas con Giemsa. Por cada lámina se contaron al menos 300 parásitos.

Metacicloogénesis inducida de *Trypanosoma cruzi*.

Epimastigotas procedentes de final de fase exponencial en medio LITB suplementado con diferentes concentraciones de glucosa (10 y 48 mM) fueron sedimentados mediante centrifugación a 8500 g y resuspendidos con un inóculo de 5×10^7 parásitos/mL en frascos Roux utilizando un volumen final de 70 mL del medio TAU3AAG (190 mM NaCl, 17 mM KCl, 2 mM CaCl₂, 2 mM MgCl₂, 10 mM L-prolina, 50 mM L-glutamato, 2 mM L-aspartato, 10 mM glucosa y 8 mM tampón fosfato pH 6.0) (19). Los parásitos se incubaron a 27° C durante 96 horas. Cada ensayo de inducción fue realizado por triplicado. Se determinó el porcentaje de tripomastigotas metacíclicos al cuarto día de incubación mediante recuento diferencial en láminas fijadas coloreadas con Giemsa.

Para la obtención de tripomastigotas metacíclicos purificados, parásitos procedentes del cuarto día de incubación en el medio TAU3AAG fueron sedimentados a 8500 g, resuspendidos en medio TAU (190 mM NaCl, 17 mM KCl, 2 mM CaCl₂, 2 mM MgCl₂, 8 mM tampón fosfato pH 6.0) y tratados con suero fresco de cobayo durante 30 minutos a 37° C y purificados a través de una columna de DEAE-celulosa (24).

Determinación de la actividad proteolítica. La actividad proteolítica se caracterizó mediante electroforesis en minigeles SDS-poliacrilamida al 10% (25) utilizando como sustrato gelatina a una concentración final de 0,1% (Sigma, G-8150). Para la preparación de las muestras a cargar en el gel, masas de 2×10^8 epimastigotas correspondientes a diferentes días de la curva de crecimiento se resuspendieron en 100 µl de tampón de lisis (187,5 mM Tris-HCl pH 6.8, 3% SDS) y se agitaron en vortex durante 15 segundos en baño de hielo. El homogenato obtenido se sedimentó a 14000 g (3 min, 4° C) en microcentrifuga Eppendorf y se tomó 10 µl del sobrenadante, al cual se le añadió 5 µl de tampón de muestra no desnaturante.

La separación electroforética se realizó a corriente constante a 4° C con una corriente constante de 10 mAmp. Una vez concluida la corrida electroforética, los geles se desmontaron y se incubaron durante 30 min a temperatura ambiente en 10 volúmenes de tampón 100 mM Tris-HCl pH 7.0 suplementado con 2,5% de Tritón X-100. Para revelar la actividad proteolítica total y cisteín proteasas los geles se incubaron en tampón de digestión (100 mM Tris-HCl pH 7.0, 2.5 mM CaCl₂, 2.5 mM ZnCl₂, 250 mM cisteína) en ausencia o presencia de inhibidores de metaloproteasas (1 mM 1.10 fenantrolina, 10 mM EDTA, 10 mM EGTA). Para la visualización de metaloproteasas se empleó el mismo tampón de digestión sin adición de cisteína y suplementado con inhibidores de cisteín proteasas [10 µM trans-epoxy succinil-L-leucilamido (4 guanidino)-butano (E-64), 100 µM N α -p-tosil-L-fenilalanina clorometil cetona (TPCK), 100 µM N α -tosil-L-cloro lisina metil cetona (TLCK)]. Las condiciones de revelado se hicieron a 37° C durante 12 horas (para visualización de actividad proteolítica total y cisteín proteasas) ó 96 horas (metaloproteasas). En todos

los casos los geles fueron teñidos con 0.25% Coomassie Blue R-250 en metanol 50%-Acido acético 10% durante 30 minutos a temperatura ambiente y se decoloraron en el mismo solvente.

Análisis densitométrico. La comparación de los perfiles y la determinación de la movilidad relativa de las bandas obtenidas se realizaron mediante densitometría utilizando un escáner BIORAD Modelo GPS-670 y los valores se calcularon con el programa Multy-Analyst versión 3.0 (BIORAD) considerando su migración respecto a los marcadores de movilidad relativa colocados en cada gel.

RESULTADOS

Para establecer el efecto de las concentraciones de glucosa sobre el crecimiento y diferenciación de *T. cruzi* (metacicloogénesis espontánea) se procedió al cultivo del parásito en presencia de baja (10 mM) y alta (48 mM) concentración de glucosa con respecto a la condición control empleada en la formulación del medio LITB en la mayoría de los laboratorios (24 mM glucosa). Se empleó el clon Dm30L (aislado de *Didelphis marsupialis*) mantenido en el laboratorio simultáneamente bajo dos esquemas de mantenimiento: mantenimiento mediante pases trimestrales chipo-ratón (condición triatomino) o mediante cultivo prolongado en medio LITB (condición cultivo). Para ello se elaboraron curvas de crecimiento (por triplicado) partiendo de un inóculo inicial de 2×10^6 parásitos/mL según lo descrito en la sección de Materiales y Métodos (Figura 1). Tomando como referencia la condición control 24 mM glucosa, en parásitos mantenidos bajo la condición triatomino, puede apreciarse que los niveles de glucosa tuvieron poco efecto sobre la fase exponencial con respecto a la condición cultivo (comparar figuras 1B y 1E), pero sí se evidenciaron cambios a nivel de la fase estacionaria, la cual se alarga en la condición triatomino (Figura 1B) y desaparece en la condición cultivo (Figura 1E). En parásitos de la condición triatomino, la reducción de los niveles de glucosa a 10 mM no tuvo un efecto significativo sobre las fases exponencial y estacionaria (comparar figuras 1A y 1B). Igual comportamiento se registra cuando se incrementó la concentración de glucosa a 48 mM, donde se mantuvo la fase exponencial, pero se reduce la fase estacionaria, iniciándose una caída en el número de parásitos móviles a partir del día 10 de la curva (Figura 1C). En parásitos de la condición cultivo, el descenso de glucosa en el medio LITB a 10 mM permitió un incremento menos acentuado de la población de parásitos, en donde no se observa una fase exponencial típica, sino un crecimiento en etapas de la población de epimastigotas (Figura 1D). Por otro lado, en la condición 48 mM glucosa, se observa desaparición de la fase estacionaria y muerte abrupta de los parásitos (Figura 1F). En la Tabla 1 se muestra que el tiempo de generación de los parásitos no experimentó cambios significativos asociados a los niveles de glucosa en el medio LITB, pero sí hubo modificaciones asociadas a la condición de mantenimiento del parásito.

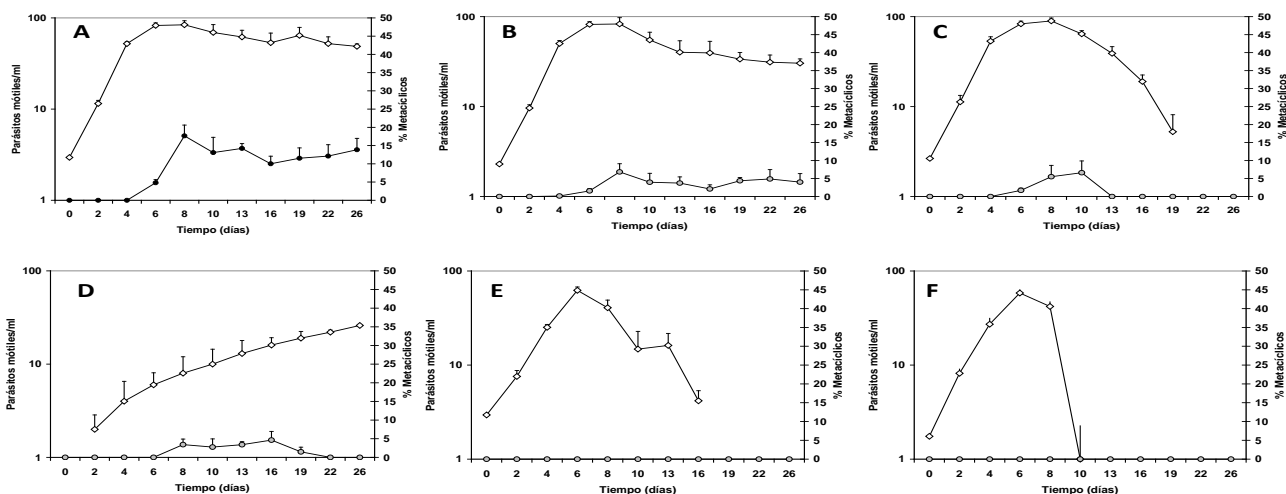


Figura 1. Curvas de crecimiento del clon Dm30L de *Trypanosoma cruzi* mantenida bajo las condiciones triatomino (A, B, C) y cultivo (D, E, F) en medio LITB suplementado con 10 mM (A, D), 24 mM (B, E) y 48 mM glucosa (C, F). El eje de la ordenada izquierda representa el recuento de parásitos vivos (◊) y la escala derecha muestra el porcentaje de metacíclicos espontáneos (○). Los puntos representan la media y las barras la desviación estándar de al menos tres ensayos experimentales.

Tabla 1. Tiempo de generación del aislado Dm30L de *T. cruzi* mantenido bajo diferentes esquemas de mantenimiento y cultivados en medio LITB con diferentes concentraciones de glucosa

Concentración de glucosa (mM) ²	TG _{1/2} (horas) ¹	
	Condición de Mantenimiento	
	Triatomino	Cultivo
10	22,3 ± 1,0	28,1 ± 0,2
24	20,2 ± 0,1	27,7 ± 2,0
48	21,3 ± 0,9	27,8 ± 1,1

¹Tiempo de generación. ²Parásitos incubados en medio LITB suplementado con 10, 24 y 48 mM glucosa. Valores representados como la media ± DS de tres experimentos.

Para establecer los efectos de la glucosa sobre la diferenciación de *T. cruzi*, se calculó el porcentaje de metacíclicos espontáneos a diferentes días de la curva de crecimiento. Tomando como punto de referencia la condición control (24 mM), se observa que los parásitos mantenidos bajo la condición cultivo (Figura 1E) pierden la capacidad diferenciante con respecto a aquellos mantenidos bajo pases alternos triatomino-ratón (Figura 1B). Sin embargo, en los parásitos cultivados en 10 mM glucosa y mantenidos bajo la condición cultivo se restituyó la aparición de metacíclicos espontáneos (Figura 1D), así como un mayor incremento en el porcentaje de metacíclicos espontáneos en la condición triatomino (Figura 1A). En la condición 48 mM glucosa hubo una caída en el porcentaje de metacíclicos en parásitos mantenidos bajo la condición triatomino (Figura 1C), con bloqueo de la metaciclogénesis en la condición cultivo (Figura 1F).

Con el objeto de asociar los cambios en la capacidad metaciclogénica con la expresión de proteasas, se obtuvo el perfil proteolítico de los parásitos cultivados en medio LITB con diferentes concentraciones de glucosa. En la figura 2 se muestra la actividad de proteasas de epimastigotas del clon Dm30L mantenido bajo la condición triatomino durante la fase de crecimiento en medio LITB empleando 10 mM glucosa.

En ausencia de inhibidores de proteasas, los epimastigotas del día 1 muestran dos bandas de 60 y 55 kDa (Figura 2A, canal 1). Entre los días 4 a 7 se registran tres actividades proteolíticas: dos de 60 y 55 kDa comunes al día 1, y otra de 45 kDa. Entre los días 11 y 23 se observa una mayor intensificación de la banda de 60 kDa, y la aparición de una banda de 40 kDa. Es de hacer notar que este último perfil coincide con la expresión de proteasas de metacíclicos purificados obtenidos a partir de medio TAU3AAG (Figura 2A, canal M). En presencia de inhibidores de metaloproteasas, se obtuvo un patrón de proteasas similar a la condición sin inhibidores, indicando que las actividades registradas pueden clasificarse como cisteín proteasas (figura 2B), mientras que no se logró detectar la expresión de metaloproteasas bajo las condiciones ensayadas (resultados no mostrados).

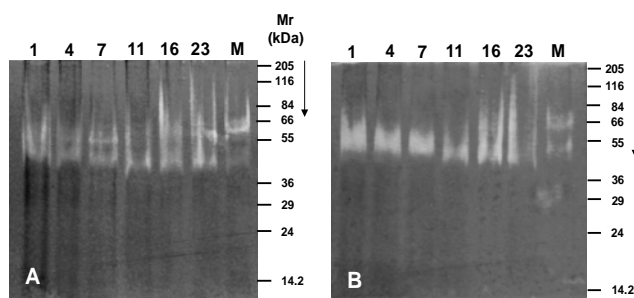


Figura 2. Perfil proteolítico en gel SDS-PAGE 10% durante la curva de crecimiento de epimastigotas del clon Dm30L de *T. cruzi* mantenido bajo la condición triatomino (2×10^8 parásitos/canal) en presencia de 10 mM glucosa empleando como sustrato gelatina (0,1%) en ausencia (A) y presencia (B) de inhibidores de metaloproteasas coloreado con Azul de Coomassie. Los números en la parte superior de cada canal corresponden al día de la curva de crecimiento y M a metacíclicos purificados. Mr indica la movilidad relativa de los marcadores de peso molecular en Kilodaltons (kDa).

Cuando el mismo clon Dm30L mantenido bajo la condición triatomino fue crecido en medio LIT 48 mM glucosa, se registró una significativa disminución de las actividades proteolíticas tanto totales (Figura 3A) como de cisteín proteasas (Figura 3B), no identificándose nuevamente actividad de metaloproteasas (resultados no mostrados).

Es de hacer notar que en este caso sólo se registró una actividad proteolítica difusa entre 60 y 55 kDa entre los días 1 y 13 de la curva de crecimiento, así como una banda de 65 kDa en metacíclicos purificados del medio TAU3AAG (Figura 3A, canal M).

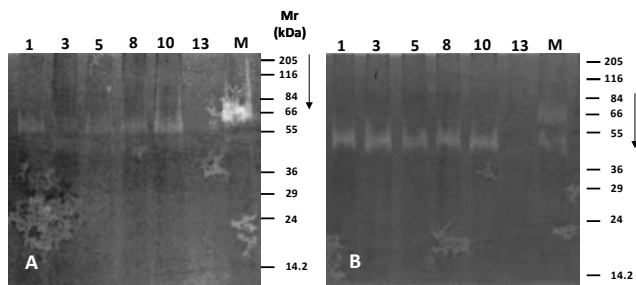


Figura 3. Perfil proteolítico en gel SDS-PAGE 10% durante la curva de crecimiento de epimastigotas del clon Dm30L de *T. cruzi* mantenido bajo la condición triatomino (2×10^8 parásitos/canal) en presencia de 48 mM glucosa empleando como sustrato gelatina (0,1%) en ausencia (A) y presencia (B) de inhibidores de metaloproteasas coloreado con Azul de Coomassie. Los números en la parte superior de cada canal corresponden al día de la curva de crecimiento y M a metacíclicos purificados. Mr indica la movilidad relativa de los marcadores de peso molecular en Kilodaltons (kDa).

Cuando el clon Dm30L mantenido bajo la condición cultivo fue crecido en medio LITB suplementado con 10 mM glucosa, se registra en el día 1 de la curva una actividad proteolítica difusa y débil entre 60 y 55 kDa, la cual se mantiene y se intensifica un poco hasta el día 16 de la curva (Figura 4A). Entre los días 4 y 16 aparece una nueva banda de 40 kDa cuya expresión se eleva ligeramente hacia el día 16. Los metacíclicos purificados a partir del medio TAU3AAG muestran un patrón electroforético de actividades proteolíticas de 60 y 52 kDa (Figura 4A, canal M). Todas estas actividades fueron clasificadas como cisteín proteasas (Figura 4B), mientras que al igual que en los casos anteriores, no se detectaron metaloproteasas (resultados no mostrados). Cuando se evaluó el perfil de proteasas de los parásitos mantenidos bajo la condición cultivo y crecidos en 48 mM glucosa, no se registró ningún tipo de actividad proteolítica (resultados no mostrados).

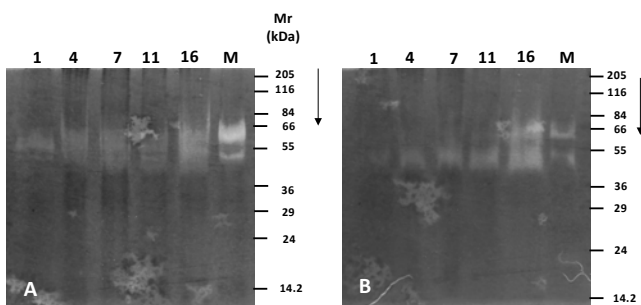


Figura 4. Perfil proteolítico en gel SDS-PAGE 10% durante la curva de crecimiento de epimastigotas del clon Dm30L de *T. cruzi* mantenido bajo la condición cultivo (2×10^8 parásitos/canal) en presencia de 10 mM glucosa empleando como sustrato gelatina (0,1%) en ausencia (A) y presencia (B) de inhibidores de metaloproteasas coloreado con Azul de Coomassie. Los números en la parte superior de cada canal corresponden al día de la curva de crecimiento y M a metacíclicos purificados. Mr indica la movilidad relativa de los marcadores de peso molecular en Kilodaltons (kDa).

Habiéndose establecido previamente que los tripomastigotas metacíclicos expresan actividades tipo metaloproteasas (3, 9) y que éstas pueden utilizarse como marcadores de diferenciación, se decidió determinar por qué no se logró la identificación de metaloproteasas en el clon estudiado en este proyecto, ni siquiera en metacíclicos purificados inducidos in vitro. Para ello se procedió a determinar la actividad proteolítica de epimastigotas y metacíclicos inducidos en medio TAU3AAG purificados mediante cromatografía procedentes de medio LITB 24 mM glucosa utilizando diferentes aislados del parásito.

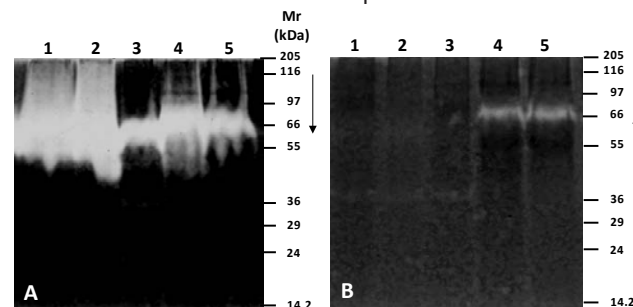


Figura 5. Perfil proteolítico en gel SDS-PAGE 10% de diferentes aislados de *Trypanosoma cruzi* (2×10^8 parásitos/canal) en ausencia (A) y presencia (B) de inhibidores de cisteín proteasas coloreado con Azul de Coomassie. Canales 1 y 2 (epimastigotas fase exponencial y estacionaria de EP triatomino, respectivamente). Canal 3 (metacíclicos purificados del clon Dm30L triatomino). Canales 4 y 5 (epimastigotas y metacíclicos del clon Dm28c). Mr indica la movilidad relativa de los marcadores de peso molecular en kilodaltons (kDa).

La Figura 5A muestra la actividad proteolítica de epimastigotas y metacíclicos de diferentes aislados de *T. cruzi* crecidos durante 6 días en medio LITB 24 mM glucosa empleando gelatina como sustrato exógeno y revelada en ausencia de inhibidores de proteasas. Se evidencia una intensa actividad proteolítica en epimastigotas tanto en la cepa EP como en el clon Dm28c (canal 4). En la cepa EP, la intensidad del revelado no permitió la identificación de bandas individuales (canales 1 y 2) mientras que en el clon Dm28c se registra cuatro bandas de 57 kDa, una banda difusa entre 60 y 70 kDa, 97 y 116 kDa. Por su parte, los tripomastigotas metacíclicos expresan una actividad proteolítica de 65 kDa siendo más intensa en la cepa EP respecto al clon Dm28c.

La Figura 5B corresponde a los resultados obtenidos cuando los diferentes estadios y aislados descritos anteriormente se incubaron en presencia de inhibidores de cisteín proteasas. En este caso se observó actividad proteolítica de 65 kDa, solamente en el clon Dm28c independientemente del estadio utilizado. Esta actividad corresponde a metaloproteasas y nos permite corroborar que el tampón y las condiciones de incubación utilizados en el presente estudio permiten la identificación de este tipo de enzimas. Los resultados presentados en la Figura 5 indican que en *T. cruzi* la expresión de metaloproteasas está asociada al aislado empleado y que la actividad de cisteín proteasas se expresa diferencialmente entre múltiples aislados y estadios del parásito. Esto explica la ausencia de actividad de metaloproteasas en las zimografías empleadas en este estudio.

DISCUSION

Nuestros resultados indican que las condiciones de mantenimiento de *Trypanosoma cruzi* en el laboratorio son capaces de provocar alteraciones en las propiedades biológicas del parásito, entre ellas el tiempo de replicación de epimastigotas, así como la capacidad de experimentar metaciclógenesis espontánea en medios de cultivo axénicos (Figura 1 y Tabla 1). Previamente demostramos que cuando *T. cruzi* es mantenido en el laboratorio simulando el ciclo de vida en la naturaleza, es decir, mediante pases alternos entre triatomino y ratón albino, se preservan propiedades biológicas del parásito, tales como la metaciclógenesis (20), así como la virulencia del parásito (21). Todo parece indicar que el cultivo prolongado por más de 15 años de aislados del parásito mediante repiques semanales en medio LITB sin pases en vector ni triatomino provoca cambios en la expresión génica no solo de cepas, sino también en poblaciones de parásitos genéticamente homogéneos como el clon Dm30L de *T. cruzi* (26).

Habiéndose demostrado mayor velocidad del consumo de glucosa en parásitos de un mismo aislado mantenido bajo la condición cultivo respecto a la condición triatomino (20), todo parece indicar que el repique prolongado en medio LITB conduce a una adaptación gradual del parásito a un medio de cultivo artefactual, con mayores niveles de glucosa a los que normalmente está expuesto en su ciclo evolutivo. Como es sabido, la metaciclógenesis ocurre normalmente en la ampolla rectal del triatomino, donde existe una orina extremadamente pobre en carbohidratos y con concentración nanomolar de aminoácidos. Esto plantea la hipótesis del estrés nutricional, donde el parásito recurre a la utilización de aminoácidos como fuente de energía. En efecto, se ha demostrado en los epimastigotas unas organelas ricas en proteínas denominadas reservosomas, las cuales desaparecen durante la metaciclógenesis y están ausentes en metacíclicos (27). Esto sugiere la degradación de estas proteínas para rendir aminoácidos como fuente de energía, con participación de proteasas del parásito.

Se ha descrito una amplia variedad de proteasas en *Trypanosoma cruzi*, principalmente de tipo cisteín proteasas, entre ellas la cruzipaína. Esta enzima presenta múltiples isoformas (28) de las cuales una fracción importante se localiza en los reservosomas (22) así como también en los lisosomas. Estas enzimas podrían jugar un papel importante en la degradación de proteínas del reservosoma tanto en la metaciclógenesis espontánea en medio LITB como inducida en el medio TAU3AAG.

Se ha demostrado incremento en la actividad de proteasas durante la fase estacionaria de epimastigotas en medio LITB (15), coincidiendo con la metaciclógenesis espontánea. Así como expresión diferencial y activación de proteasas durante la metaciclógenesis inducida en el medio TAU3AAG (3). En apoyo a la teoría de que la metaciclógenesis está asociado a la activación del metabolismo proteico del parásito, está reportado que inhibidores de proteasas (3, 29), así como el

uso de inhibidores del transporte de glucosa como ploretina (30) son capaces de bloquear o inducir la metaciclógenesis, respectivamente.

Habiéndose observado que parásitos mantenidos en cultivo presentan menor porcentaje tanto de metacíclicos espontáneos (Figura 1) como inducidos en TAU3AAG con respecto a parásitos mantenidos bajo la condición natural (20), quisimos evaluar la actividad de proteasas en un mismo aislado mantenido bajo idénticas condiciones (triatomino o cultivo) crecidos en medio LITB con equivalente concentración de glucosa. El medio LITB utilizado ampliamente en la mayoría de los laboratorios presenta en su formulación una concentración final de 24 mM glucosa (23). Estudios realizados en este medio estándar han demostrado que los epimastigotas presentan un metabolismo preferiblemente glicolítico, caracterizado por ausencia de regulación de las enzimas hexoquinasa y fosfofructoquinasa (31), y con metabolismo proteolítico basal muy bajo, que sólo se incrementa al agotarse completamente la glucosa (20). Por esta razón quisimos evaluar la actividad proteolítica cultivando parásitos del clon Dm30L mantenido en diferentes condiciones en el laboratorio en medios con baja (10 mM) y alta (48 mM) concentración de glucosa.

Se observa que cuando el clon Dm30L mantenido bajo la condición triatomino fue cultivado en 10 mM glucosa, se evidenció una actividad proteolítica en el día 1 que contempla básicamente dos cisteín proteasas de 60 y 55 kDa, las cuales se corresponden con otras previamente descritas en epimastigotas (15). A partir del cuarto día se evidencia intensificación de estas bandas y aparece una actividad de 45 kDa. A partir del día 11, que coincide con el agotamiento de los carbohidratos del medio (20), se registra activación de la banda de 60 kDa, probablemente la cruzipaína del parásito, así como una banda de 40 kDa que podría corresponder a la actividad proteolítica de igual movilidad relativa descrita en epimastigotas diferenciadas (3). Esta última actividad proteolítica coincide con el pico de metacíclicos espontáneos. A pesar de que en el día 15 sólo se registra un 13% de tripomastigotas metacíclicos (figura 1A), el recuento diferencial indica que tenemos una mezcla de epimastigotas, metacíclicos y formas en diferenciación que aún no ha completado su transformación hacia metacíclicos. De hecho, es posible que los epimastigotas expresen un perfil de metacíclicos sin experimentar la transformación morfológica (32). En apoyo a esta idea, metacíclicos purificados de medio TAU3AAG utilizados como control de la expresión de proteasas de ese estadio muestran esas mismas dos bandas previamente descritas (Figura 2A, canal M).

Cuando el mismo aislado mantenido bajo la condición triatomino fue cultivado en 48 mM glucosa, se registró no sólo una significativa reducción de la intensidad de la actividad proteolítica, sino también sólo se expresó una actividad difusa entre 60 y 55 kDa entre los días 1 y 13 de la curva, que pudiera corresponder a la cruzipaína del parásito

y la cual se intensificó entre los días 8 y 10, coincidiendo con la disminución de los carbohidratos del medio de cultivo (20). Esto sugiere que la actividad proteolítica pudiera estar regulada por una parte, a la expresión de estas enzimas, la cual a su vez está en función de los niveles de glucosa en el medio de cultivo.

Cuando se cultivó el clon Dm30L mantenido bajo la condición cultivo en medio LITB suplementado con 10 mM glucosa, ocurre diferencias cuantitativas y cualitativas en la expresión de proteasas, con visualización de una banda difusa entre de 60 y 55 kDa (día 1) con aparición a partir del cuarto día de una banda de 40 kDa. Aquí los metacíclicos purificados muestran un perfil compatible con los obtenidos con el mismo aislado cultivado en 10 mM de la condición triatomino.

Es importante destacar que aún cuando bajo estas condiciones se logra el agotamiento total de la glucosa en el medio de cultivo (previamente demostrado y publicado) (20), no se logró un incremento significativo de la actividad proteolítica, aún en la fase estacionaria de cultivo, la cual resultó ser comparable a la mostrada por el parásito de la condición triatomino en altas concentraciones de glucosa (Figura 3). Se plantea entonces la posibilidad de que la condición cultivo afecta la expresión de proteasas del parásito, hasta tal punto de que aún ante la ausencia total de carbohidratos, se evidencia una actividad basal que fue capaz de responder ante el estímulo del estrés nutricional. Por otro lado, cuando este mismo aislado mantenido bajo la misma condición cultivo fue crecido es 48 mM glucosa, no se evidenció ningún tipo de actividad proteolítica bajo las condiciones ensayadas (resultados no mostrados). Sabiendo que en este caso no hubo agotamiento de carbohidratos del medio (20), esto sugiere que existe un bloqueo en la expresión de estas enzimas que sólo se revierte ante la presencia de un estrés nutricional.

En vista de que no se logró detectar la expresión de metaloproteasas durante los ensayos, se decidió corroborar si esto era consecuencia de la metodología empleada o debido a la constitución genética del parásito. En la Figura 5A se evidencia que la expresión de proteasas totales fue mucho más acentuada en parásitos de los aislados EP y Dm28c mantenidos en la condición triatomino y cultivados en medio LITB con 24 mM glucosa con respecto al clon Dm30L, independientemente de su esquema de manutención en el laboratorio. Es de hacer notar la expresión de dos cisteín proteasas de 97 y 116 kDa en epimastigotas del clon Dm28c de *T. cruzi* (Figura 5A, canal 4) previamente descritas en epimastigotas de fase estacionaria (15). Sin embargo, sí se logró la detección de metaloproteasas en epimastigotas y metacíclicos del clon Dm28c, coincidiendo con resultados previos (9), indicando que la expresión de este tipo de proteasa varía en función del aislado empleado, y confirmando la ausencia de expresión de este tipo de enzima en el clon Dm30L.

A pesar de que se ha reportado la expresión de serín proteasas en *T. cruzi* (10, 11), no se identificó este tipo de

enzima en el presente trabajo. Esto es debido a la utilización de TLCK y TPCK en los tampones de digestión, los cuales inhiben tanto cisteín como serín proteasas. De la misma forma, no se realizó la identificación de aspartil proteasas en las condiciones de revelado de las actividades proteolíticas.

Los resultados presentados en el siguiente trabajo muestran que hay una expresión constitutiva de proteasas que varía en función del aislado de *Trypanosoma cruzi* y cuya actividad sufre cambios durante la curva de crecimiento de epimastigotas en medio LITB. No obstante, las condiciones de mantenimiento del parásito en el laboratorio afectan la expresión de enzimas proteolíticas.

Los resultados presentados en las figuras 2A y 4A parecen indicar que el cultivo prolongado de *Trypanosoma cruzi* durante más de 15 años bajo la condición cultivo, conduce a cambios en la expresión génica, evidenciadas por una menor expresión basal de proteasas del parásito.

Sabiendo que los epimastigotas poseen un metabolismo eminentemente glicolítico, esto parece indicar que existe un aumento en la expresión de estas proteínas en función de la concentración de carbohidratos del medio, explicando su mayor actividad en epimastigotas de fase estacionaria. Corroborando esta hipótesis, parásitos de la condición triatomino redujeron significativamente la actividad de proteasas cuando fueron cultivados en presencia de altas concentraciones de carbohidratos (comparar figuras 2 y 3).

Habiéndose registrado una asociación directa entre actividad de proteasas y la aparición de metacíclicos espontáneos, todo parece indicar la participación de estas enzimas en el proceso de diferenciación del parásito. En efecto, se ha demostrado que los parásitos de las cepas EP y el clon Dm28c, los cuales expresan mayor actividad proteolítica que el clon Dm30L mantenido bajo la misma condición triatomino, también presentan mayor porcentaje de metacíclicos espontáneos (20, 21). Por otro lado, el mantenimiento de la cepa EP bajo la condición cultivo no sólo condujo a una reducción significativa de la actividad proteolítica (resultados no mostrados), sino también condujo a una reducción significativa de la metaciclologénesis espontánea (20). En apoyo a esta idea, se ha demostrado que la transfección de *Trypanosoma cruzi* con múltiples copias de cruzipaina conducen a un aumento significativo de la metaciclologénesis en el parásito (33).

AGRADECIMIENTO. Al Sr. Johny Albanese por su apoyo en la infraestructura del laboratorio. Este trabajo se realizó con el financiamiento del Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico de la Universidad de Carabobo a través de los proyectos CDCH-2010-001 y CDCH-AM-394-2010.

REFERENCIAS

1. Cazzulo JJ, Couso R, Raimondi A, Wernstedt C, Hellman U. Further characterization and partial amino acid sequence of a cysteine proteinase from *Trypanosoma cruzi*. Mol Biochem Parasitol 1989; 33(1):33-41

2. Bontempi E, Martínez J, Cazzulo JJ. Subcellular localization of a cysteine proteinase from *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol* 1989; 33(1):43-47
3. Bonaldo MC, D'Escofier LN, Salles J, Goldenberg S. Characterization and expression of proteases during *Trypanosoma cruzi* metacyclogenesis. *Exp Parasitol* 1991; 73:44-51.
4. Martínez J, Cazzulo JJ. Anomalous electrophoretic behavior of the major cysteine proteinase (cruzipain) from *Trypanosoma cruzi* in relation to its apparent molecular mass. *FEMS Microbiol Lett* 1992; 95:225-230.
5. García MP, Nóbrega O, Teixeira ARL, Sousa MV, Santana JM. Characterization of a *Trypanosoma cruzi* acidic 30 kDa cysteine protease. *Mol Biochem Parasitol* 1998; 91:263-272.
6. Bongertz V, Hungerer KD. *Trypanosoma cruzi*: isolation and characterization of a protease. *Exp Parasitol* 1978; 45:8-18.
7. Greigh S, Ashall F. Electrophoretic detection of *Trypanosoma cruzi* peptidases. *Mol Biochem Parasitol* 1990; 39:31-38.
8. Duschak VG, Barboza M, García GA, Lammel EM, Couto AS, Isola EL. Novel cysteine proteinase in *Trypanosoma cruzi* metacyclogenesis. *Parasitol* 2006; 132(3):345-355.
9. Lowndes CM, Bonaldo MC, Thomaz N, Goldenberg S. Heterogeneity of metalloprotease expression in *Trypanosoma cruzi*. *Parasitol* 1996; 112:393-399.
10. Burleigh BA, Caler EV, Webster P, Andrews N. A cytosolic serine endopeptidase from *Trypanosoma cruzi* is required for the generation of Ca²⁺ signaling in mammalian cells. *J Cell Biol* 1997; 136(3):609-620.
11. da Silva-Lopez RE, Morgado-Díaz JA, dos Santos PT, Giovanni-De-Simone S. Purification and subcellular localization of a secreted 75 kDa *Trypanosoma cruzi* serine oligopeptidase. *Acta Trop* 2008; 107(2):159-167.
12. Pinho RT, Beltrami LM, Alves CR, De-Simone SG. *Trypanosoma cruzi*: isolation and characterization of aspartyl proteases. *Exp Parasitol* 2009; 122(2):128-133.
13. Yokoyama-Yasunaka JKU, Pral EMF, Oliveira OC, Alfieri SC, Stolf MS. *Trypanosoma cruzi*: identification of proteinases in shed components of trypomastigote forms. *Acta Tropica* 1994; 57:307-315.
14. Nogueira de Melo AC, de Souza EP, Elias CG, dos Santos AL, Branquinha MH, d'Ávila-Levy CM, dos Reis FC, Costa TF, Lima AP, de Souza Pereira MC, Meirelles MN, Vermelho AB. Detection of matrix metalloproteinase-9-like proteins in *Trypanosoma cruzi*. *Exp Parasitol* 2010; 125(3):256-263.
15. Pance A, Henríquez D. Changes in proteolytic activity during the growth of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. *Biochem Int* 1992; 27:613-623.
16. Camargo EP. Growth and differentiation in *Trypanosoma cruzi*. I. Origin of metacyclic trypanosomes in liquid media. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 1964; 6:93-100
17. Osuna A, Adroher FJ, Lupiáñez JA. Influence of electrolytes and non-electrolytes on growth and differentiation of *Trypanosoma cruzi*. *Cell Diff Develop* 1990; 30:89-95.
18. Cáceres O, Fernandes JF. (1976) Glucose metabolism, growth and differentiation of *T. cruzi*. *Rev Bras Biol* 1976; 36:397-410.
19. Contreras VT, Salles JM, Thomas N, Morel CM, Goldenberg S. *In vitro* differentiation of *Trypanosoma cruzi* under chemically defined conditions. *Mol Biochem Parasitol* 1985; 16(3):315-327.
20. De Lima AR, Navarro MC, Arteaga R, Contreras VT. Cultivation of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes in low glucose axenic media shifts its competence to differentiate at metacyclic trypomastigotes. *Exp Parasitol* 2008; 119(3):336-342
21. Contreras VT, Araque W, Delgado VS. *Trypanosoma cruzi*: metacyclogenesis in vitro I. Changes in the properties of metacyclic trypomastigotes maintained in the laboratory by different methods. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1994; 89(2):253-9.
22. Soares MJ. The reservosome of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes: an organelle of the endocytic pathway with a role on metacyclogenesis. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1999; 94(1):139-141.
23. Goitia-Aular M, Boisso, J F. Cultivo del *Trypanosoma cruzi* (cepa Elpidio Padrón) en medio semidefinido. Efecto de algunas variaciones en la composición y condiciones del mismo. *Acta Cient Venezol* 1982; 33: 488-496.
24. De Souza, MA. A simple method to purify biologically and antigenically preserved bloodstream trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi* using DEAE-cellulose columns. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1983; 78:317-333.
25. Laemli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227:680-685.
26. Contreras VT, De Lima AR, Zorrilla G. *Trypanosoma cruzi*: Maintenance in culture modify gene and antigenic expression of metacyclic trypomastigotes. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1998; 93(6):753-760.
27. Soares MJ, Souto-Pradrón T, Bonaldo MC, Goldenberg S, de Souza W. A stereological study of the differentiation process in *Trypanosoma cruzi*. *Parasitol Res* 1989; 75:522-527.
28. Campetella O, Henriksson J, Aslund L, Frasch ACC, Pettersson U, Cazzulo JJ. The major cysteine proteinase (cruzipain) from *Trypanosoma cruzi* is encoded by multiple polymorphic tandemly organized genes located on different chromosomes. *Mol Biochem Parasitol* 1992; 50:225-234.
29. Franke de Cazzulo BM, Martínez J, North MJ, Coombs GH, Cazzulo JJ. Effects of proteinase inhibitors on the growth and differentiation of *Trypanosoma cruzi*. *FEMS Microbiol Lett* 1994; 124:81-86.
30. Adroher FJ, Osuna A, Lupiáñez JA. Phloretin and citrate promote the differentiation rate from epimastigotes to metacyclic forms of *Trypanosoma cruzi*. *Acta Tropica* 1992; 50:79-85.
31. Urbina JA, Crespo A. Regulation of energy metabolism in *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi* epimastigotes. I. Hexokinase and phosphofructokinase. *Mol Biochem Parasitol*. 1984; 11:225-39.
32. Contreras VT, Morel CM, Goldenberg S. Stage specific gene expression precedes morphological changes during *Trypanosoma cruzi* metacyclogenesis. *Mol Biochem Parasitol*. 1985; 14(1):83-96.
33. Tomas AM, Miles MA, Kelly JM. Overexpression of cruzipain, the major cysteine proteinase of *Trypanosoma cruzi*, is associated with enhanced metacyclogenesis. *Eur J Biochem* 1997; 244:596-603.

Salus



POLÍTICA GENERAL DE LA REVISTA INSTRUCCIONES PARA LOS AUTORES

Revista de la Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad de Carabobo

Salus es un revista arbitrada de divulgación científica multidisciplinaria editada por la Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad de Carabobo, Valencia, Venezuela. Publica artículos originales de trabajos de investigación biomédica en los diferentes campos de la investigación básica y/o aplicada. La periodicidad anual comprende un volumen, tres números y un suplemento especial distribuidos gratuitamente y difundidos vía internet <http://servicio.bc.uc.edu.ve/fcs/index.htm> y <http://salus-online.fcs.uc.edu.ve/> (*Salus Online*)

Salus se encuentra indizada en EMBASE, REVENCYT (Revistas Científicas de Ciencia y Tecnología, código RV5001) FUNDACITE Mérida; incluida en el registro de publicaciones científicas y tecnológicas venezolanas del FONACIT

<http://www.fonacit.gob.ve/publicaciones/indice.asp> y registrada en Catálogo LATINDEX (Folio 10060), Sistema Regional de Información en Línea para Científicas de América Latina, España y Portugal, <http://www.latindex.unam.mx/buscador/ficRev.html?opcion=2&folio=10060> y en las bases de datos PERIÓDICA, DOJA, Scientific Electronic Library Online (SciELO) <http://www2.scielo.org.ve> y suscrita como Miembro de la Asociación de Editores de Revistas Biomédicas Venezolanas - ASEREME.

En *Salus* podrán ser publicados los siguientes tipos de trabajos:

Tópicos de Actualidad. Trata temas, hechos o episodios de investigación novedosos, presentados por miembros de la comunidad científica en general. El Comité Editorial se reserva el derecho de seleccionar el tema que considere relevante e invitar a expertos o especialistas en la materia seleccionada.

Artículo Original. Presenta un estudio inédito, completo y definido con aplicación estricta del método científico.

Artículo de Revisión. Trata de un tema de interés general mediante una revisión actualizada de la bibliografía reciente. Deben ser escritas preferentemente por especialistas en el campo objeto de la revisión y contener las contribuciones del autor con la discusión del tema revisado. No se aceptarán revisiones que consistan en una descripción bibliográfica sin incluir un análisis.

Ensayo. Aborda un tema en profundidad relacionado con la ciencia y/o profesión en el área de la salud, que por no estar basado en datos experimentales propios, el autor analiza y sustenta su opinión con la bibliografía más relevante consultada sobre el tema y emite su opinión al respecto y concluye resaltando los aportes más significativos en el contexto de su exposición.

Caso Clínico. Describe patologías nuevas, poco frecuentes o de difícil diagnóstico y tratamiento. Deben incluir la descripción del caso, seguida de una discusión con el soporte bibliográfico correspondiente.

Nota Breve. Expone resultados preliminares, modificaciones a técnicas, métodos o procedimientos. Estas comunicaciones breves no deben representar la publicación preliminar de informes completos que estén en preparación. Un breve resumen inicial debe incluir los fundamentos, los hallazgos principales y la conclusión.

Honor a Quien Honor Merece. Reseña la vida y obra de una persona o institución de relevancia en las ciencias biomédicas.

Comité Editorial *Salus*

Presidente del Consejo Superior
José Corado

Editora
Marisol García de Yegüez

Co-Editor
Germán González

Coordinador Salus Online
Ricardo Montoreano

Asesor técnico
Milagros Espinoza

Miembros
Amarilis Guerra, Harold Guevara, Yalitzta Aular, Belén Salinas, Aldo Reigosa.

Asesores
Mercedes Márquez, Cruz Manuel Aguilar CIET), Wolfan Araque, Guillermo Wittembury (IVIC), Michael Parkhouse (Instituto Gulbenkian de Ciencia, Portugal), Juan Ernesto Ludert (CINVESTAV, México), César Pérez Maldonado (Fac. Bioanálisis y Farmacia Dpto. Inmunología.ULA), Esmeralda Vizzi (IVIC)

Colaboradores
Jeannette Silva (Dpto. Idiomas)
Mayra Rebolledo (webmaster)

Correctores de redacción y estilo
Jeannette Silva, Sioly Mora de Orta, Luis Díaz

Árbitros
Miembros del personal docente y de investigación de la Universidad de Carabobo y otras instituciones de educación superior (ver lista en la última página)

Cartas al Editor. Sobre comentarios, opiniones, preguntas o críticas a los artículos de la última edición de la revista. Debe acompañarse de una carta al Comité Editorial, suscrita por el autor de la comunicación y podrán ser enviadas al Editor de *Salus*, vía internet, a través de la dirección: salus@uc.edu.ve

INSTRUCCIONES PARA LOS AUTORES

Los manuscritos deben ser claros, concisos, en formato Word y exactos en el uso idiomático del lenguaje especializado. Para el estilo, formato, calidad, claridad y uniformidad de la información contenida en los manuscritos, se recomienda a los autores adherirse a las normas contenidas en: "Requisitos de Uniformidad para Manuscritos Presentados a Revistas Biomédicas del Comité Internacional de Editores de Revistas Biomédicas" disponible en:

- <http://www.revespcardiol.org/sites/default/files/elsevier/NormOrga/025normas.pdf>
- <http://es.scribd.com/doc/54813498/Normas-de-Vancouver>
- http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html o www.icmje.org/

Además, los autores deben ajustarse a las normas de estilo especificadas por la revista que se adecuen a los de uniformidad arriba citada. Las opiniones, ideas o sugerencia son de exclusiva responsabilidad de los autores firmantes de los trabajos o de cualquier otra forma de publicación. *Salus*, se compromete a publicar los trabajos que cumplan con disposiciones de Helsinki o similares, disponibles en: http://www.fisterra.com/mbe/investiga/declaracion_helsinki.asp

Requisitos para la consignación de publicaciones a la Revista:

Los manuscritos sometidos a evaluación para publicación deben ir acompañados de:

1. Solicitud de publicación y constancia de participación firmada por cada uno de los autores.
2. Listado de recaudos exigidos para la recepción y publicación de los trabajos, disponibles en: http://salus-online.fcs.uc.edu.ve/requisitos_salus.pdf firmado por el autor de correspondencia y otros documentos necesarios para la reproducción y publicación en *Salus*.

El idioma principal es el castellano y secundariamente el inglés.

Para lograr uniformidad en la organización y contenido de los artículos a publicarse, los autores deberán cumplir con los siguientes requisitos:

1. Enviar tres (3) ejemplares del Trabajo en hojas tamaño carta; los márgenes superior, inferior y derecho de 2,5 cm. y margen izquierdo de 3 cm.; numeración de páginas en el margen superior derecho, fuente Arial 12 e interlineado doble (excepto el Resumen y las Referencias, que van a interlineado sencillo). El texto se realizará sin sangría, con títulos centrados en mayúscula y negrita y cada apartado escrito en forma continua. Se podrán incluir subtítulos cuando sea necesario. Para otro tipo de presentación se deberá consultar al Comité Editorial.

2. Enviar una (1) versión electrónica en CD, identificado con el título corto del trabajo, el autor de correspondencia y la fecha. También se incluirá en un archivo aparte, las figuras y las tablas.

3. La extensión máxima permitida dependerá del tipo de trabajo:

Artículo Original, de Revisión y Ensayo: máximo de 20 páginas. **Caso Clínico:** máx., 10 páginas. **Nota Breve:** máx., 5 páginas, con un máximo de 2 figuras o tablas. **Honor a Quien Honor Merece:** máx., 5 páginas. **Tópicos de Actualidad y Cartas al Editor:** máx., 2 páginas.

4. El orden y estructura de los trabajos experimentales será el siguiente: Título, título corto o tituliillo, resumen/palabras clave en español, título en inglés, resumen (abstract) / palabras clave (keywords) en inglés, introducción, materiales y métodos, resultados, discusión (resultados y discusión van por separados, es decir, en secciones apartes cada uno), agradecimientos (opcional), financiamiento (opcional), referencias (los enlaces deben estar activos, debe mantenerse la misma estructura en todas las citas de las publicaciones del mismo tipo: sea libro, revista, etc.).

En la primera página se deberá indicar: El **Título** del trabajo (en minúscula, negrita, conciso, que no exceda de 90 caracteres); nombre y apellido de los autores (en minúscula, negrita y cursiva, sin título, ni grado académico); Institución(es) de adscripción de los autores, indicando con números consecutivos las correspondientes a los diferentes autores; Autor de correspondencia del artículo con dirección electrónica y número de teléfono o celular; Título corto (3-6 palabras) que sirva para identificar el trabajo.

En la segunda página se incluirá: Título, Resumen y palabras clave en español y en inglés, sin incluir los nombres de los autores.

Resumen. Expresa los objetivos, metodología, resultados y discusión. No debe contener referencias, ni ser estructurado, con una extensión máxima de 250 palabras y de 3 a 6 palabras clave en ambos idiomas. Debe ser escrito en español e inglés, incluyendo el título. Para las palabras clave en castellano se recomienda la utilización de los Descriptores en Ciencias de la Salud DeCS de BIREME,

disponible en <http://decs.bvs.br/E/homepage.htm>. Para seleccionar las palabras clave en inglés se recomienda la utilización de los términos del Medical Subject Headings (MeSH) disponible en

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=mesh>

Introducción: Debe resumir antecedentes, fundamentos y objetivos del estudio haciendo referencias breves al tema.

Materiales y métodos: Describen los sujetos que intervienen en el estudio, indicando los criterios éticos, los métodos experimentales o estadísticos. Identifica químicos, fármacos y equipos (reseñando el fabricante), empleando las unidades de medidas del Sistema Internacional (SI) (http://es.wikipedia.org/wiki/Unidades_derivadas_del_SI) con sus abreviaturas y cuando se empleen fórmulas se diagramarán en una línea (ej: $m/s^2 = m \cdot s^{-2}$. Así, el símbolo M (molar) debe reemplazarse por mol/L o mol.L⁻¹ y mM será mmol/L.

Resultados: Presentados en pretérito siguiendo un orden lógico en texto, tablas y figuras. No debe repetirse en el texto la información contenida en las tablas o figuras. Se deben destacar sólo las observaciones más relevantes.

Tablas: Insertadas en el lugar del texto que corresponda, con títulos breves ubicados en la parte superior de la misma, numeradas consecutivamente en números arábigos y que no dupliquen material del texto. Las tablas no deben llevar líneas verticales para separar las columnas. Las notas referentes a lo expresado en el cuerpo de la tabla deben ser incorporadas al final de la misma, colocando los símbolos correspondientes. No se debe usar la barra espaciadora, ni tabs. Se debe tener cuidado de colocar comas en los decimales si el artículo está escrito en español o puntos si está en inglés. Anexar en el CD un archivo aparte dedicado a las tablas.

Figuras. Numeradas en arábigos y una por página. Enviadas preferiblemente en formato electrónico deben contener una leyenda donde se incluya el número de la figura (Fig. —) y suficiente información que permita su interpretación sin recurrir al texto.

Fotografías. Con contraste adecuado para su reproducción, deben incluirse en el texto y enviarse en original y dos copias, con título corto y explicativo en sí mismo. Identificando al reverso: la figura, el primer autor y la ubicación en el texto, indicando con una equis "x", el ángulo superior derecho real de la figura. Las explicaciones deberán ser incluidas en la leyenda al pie de figura para facilitar la comprensión sin necesidad de recurrir a la lectura del texto.

Cuando se envíen figuras o fotografías digitales, éstas deben conservar el archivo fuente original (formato jpg, gif, tif). Las figuras deben tener al menos 1200 dpi de resolución y las fotografías, 300 dpi. Anexar en el CD un archivo aparte dedicado a las figuras.

Fuentes. Se entiende que las figuras y tablas son originales del trabajo. Sólo en caso de ser tomadas de otra fuente, deberá indicarse la referencia.

Discusión: Destaca lo novedoso y las conclusiones del estudio, evitando repetir la información detallada en la Introducción, Materiales y Métodos y Resultados. Relacione los hallazgos con otros estudios publicados.

Agradecimientos (Opcional): Especifican las colaboraciones de personas que no justifiquen la aparición como autores o las contribuciones intelectuales como asesoría, revisión crítica del trabajo, recolección de datos, etc.

Financiamiento (Opcional): Señala la(s) institución(es) que aportó el dinero para la realización del trabajo.

Referencias: Presentadas según las Normas de Vancouver, disponibles en: http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html. Solo se aceptarán las citas para reforzar o apoyar una idea o hallazgo. La enumeración se realizará en orden correlativo según su aparición por primera vez en el texto y se identificará mediante números arábigos entre paréntesis. Evitar las citas de resúmenes de congresos, comunicaciones personales o trabajos enviados a publicación.

Revistas: Apellido e inicial (es) de los autores, sin puntos, (no se aceptará y col.); título completo del artículo, utilizando mayúscula solo para la primera letra de la palabra inicial; título abreviado de la revista según indicaciones del Index Medicus (<http://www.nlm.nih.gov>); año de publicación seguido de (;); volumen seguido de (:); números de las páginas (inicial-final), separadas por un guión. Ejemplo: Vega KJ, Pina I, Krevsky B. Heart transplantation is associated with an increased risk for pancreaticobiliary disease. *Ann Intern Med* 1996;124:980-98.

Libros y otras monografías: Apellido e inicial (es) de los autores; título del trabajo; apellido e inicial (es) de los editores; título del libro; edición; editorial; ciudad donde la obra fue publicada; año; páginas citadas (inicial-final). Ejemplo: Phillips SJ, Whisnant JP. Hypertension and stroke. En: Laragh JH, Brenner BM, editors. *Hypertension: pathophysiology, diagnosis and management*. 2nd. ed. Raven Press. New York 1995; p.465-478.

Capítulos de libros: Meltzer PS, Kallioniemi A, Trent JM. Chromosome alterations in human solid tumors. En: Vogelstein B, Kinzler KW, editors. *The genetic basis of human cancer*. New York: McGraw-Hill; 2002. p. 93-113.

Tesis: González GG. Epidemiología molecular de virus entéricos en niños con diarrea aguda. [Tesis doctoral]. Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC); 2008.

Memorias de Congresos: Cárdenas E, Peñaloza S, Urdaneta R, Bonfante-Garrido R. Un estudio seroepidemiológico de la

toxoplasmosis en áreas rurales del estado Lara, Venezuela (Resumen). Memorias del XIV Congreso Latinoamericano de Parasitología, 1999. Acapulco, México. p 21.

Página principal en un sitio Web: Sólo se recomiendan cuando proceden de alguna agencia gubernamental o de organización internacional de prestigio. Debe incluirse: nombre del autor u organización, título del documento, dirección URL (página web) y fecha de la consulta. Ejemplo: National Institute of Health Consensus Development Conference Statement, 1995. Physical Activity and Cardiovascular Health. Disponible en:

<http://www.medscape.com/govNIM/1999/guideline/NIM-card/NIH-card-toc.html>. (Acceso 23 de abril 2000).

Comunicaciones personales: debe acompañarse de una carta al Comité Editorial suscrita por el autor de la comunicación.

Para otro tipo de referencia, consultar Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals, 2000. <http://www.icmje.org>

Envío de artículos y correspondencia:

Los manuscritos deben ser enviados vía internet, a través de la dirección: salus@uc.edu.ve y entregados en la Dirección-Editorial de la Revista *Salus*: Universidad de Carabobo, Facultad de Ciencias de la Salud, Área Básica de Medicina, Dirección de Investigación y Producción Intelectual, Oficina de *Salus*. (Al frente de la Escuela de Ingeniería Química), Naguanagua. Estado Carabobo-Venezuela.

Sistema de Arbitraje: Todas las solicitudes de publicación serán sometidas a evaluación por parte del Comité Editorial, a objeto de verificar si se ajusta a las Instrucciones para los Autores. En caso negativo, será inmediatamente devuelto a él (los) autor(es). Si reúnen las condiciones establecidas por la Revista, el Comité Editorial designará dos (2) o más árbitros expertos en el área correspondiente, quienes dispondrán de un lapso no mayor a 30 días para la consignación de la evaluación. Una vez recibida la consignación de las evaluaciones, el Comité Editorial procederá a la revisión de los veredictos. El (los) autor(es) sólo podrán hacer las correcciones recomendadas por los árbitros o el Comité Editorial.

La revista *Salus*, además de la publicación en papel, también lo hace en versión electrónica, en: <http://servicio.bc.uc.edu.ve/fcs/index.htm> o <http://salus-online.fcs.uc.edu.ve/>. (*Salus on line*)

Para los aspectos de estilo no previstos en este instructivo, el Comité Editorial aceptará los señalados en los Requisitos de Uniformidad para Manuscritos Presentados a Revistas Biomédicas y recomienda revisar el último número de la revista *Salus* a los fines de facilitar la preparación del manuscrito.

El Comité Editorial se reserva el derecho de aceptar o rechazar los manuscritos recibidos y realizar las correcciones editoriales que estime necesarias; en dicho caso, informará al autor (es) al respecto, justificando el rechazo de la publicación o la necesidad de realizar dichos cambios, en beneficio de la publicación como es de la política editorial de la revista. La Revista *Salus* no se hace responsable ni solidario con los juicios emitidos por los autores de los trabajos que en definitiva se autoricen publicar.

Salus



GENERAL POLICIES AND INSTRUCTIONS TO AUTHORS

Journal of the Faculty of Health Sciences, University of Carabobo

Salus is an arbitrated multidisciplinary journal issued by the Faculty of Health Sciences of the University of Carabobo, Valencia, Venezuela. It publishes original biomedical research articles from the various fields of basic and/or applied science. One volume, three issues and a special supplement are published yearly, which are distributed free of charge, both in print, and online at: <http://servicio.bc.uc.edu.ve/fcs/index.htm> y <http://salus-online.fcs.uc.edu.ve/> (*Salus on line*).

Salus is indexed in EMBASE, REVENCYT (Science and Technology Scientific Journals, code RV5001), FUNDACITE Mérida; which is included in FONACIT's Venezuelan science and technology publications.

<http://www.fonacit.gob.ve/publicaciones/indice.asp> and registered in the LATINDEX Catalog (Folio 10060), and registered in the Regional System of Online Information Catalog for Latin America, Spain and Portugal Scientific Journals, <http://www.latindex.unam.mx/buscador/ficRev.html?opcion=2&folio=10060>. It is also registered in the PERIODICA, Scientific Electronic Library Online (SciELO) databases, and a member of ASEREME, the Association of Publishers of Venezuelan Biomedical Journals.

The following types of articles can be published in *Salus*:

Current Topics. Novel issues, facts or research notes written by members of the scientific community in general. The Editorial Board reserves the right to select the topic in terms of its relevance, and of inviting experts or specialists in the chosen subject.

Original Article. A complete, unpublished and defined research study requiring strict compliance with the scientific method.

Review Article. It deals with a general-interest issue, supported by pertinent current literature. Preferably, it should be written by an expert on the field, and the discussion should include contributions by the author. Reviews consisting of a mere review of the literature, without analysis and discussion, will not be accepted.

Essay. An in-depth report dealing with important aspects of the health sciences and/or the professional practice in the health field. Since no data from the author's own work is involved, it should include a critical assessment of the topic by the author, supported by current literature, as well as his/her own views. The conclusion should highlight the most significant contributions of the paper.

Clinical Case Report. It is a description of new or low-frequency pathologies, or of those difficult to diagnose and/or treat. It should include a detailed description of the case, followed by a discussion supported by current, pertinent literature.

Brief Report. It consists of short reports of preliminary results, or modified techniques and/or methods. They should not be a preliminary presentation of already completed studies.

A short summary should include the fundamentals, the major findings and the conclusions.

Editorial Board *Salus*

Dean - President of the Higher Council
José Corado

Editor
Marisol García de Yegüez

Co-Editor
Germán González

Coordinator Salus online
Ricardo Montoreano

Technical Advisor
Milagros Espinoza

Members
Amarilis Guerra, Harold Guevara, Yalitz Aular, Belen Salinas, Aldo Reigosa.

Advisors
Mercedes Márquez, Cruz Manuel Aguilar (CIET), Wolfan Araque, Guillermo Wittermbury (IVIC), Michael Parkhouse (Instituto Gulbenkian de Ciencia, Portugal), Juan Ernesto Ludert (CINVESTAV, México), César Pérez Maldonado (Fac. Bioanálisis y Farmacia Dpto. Inmunología.ULA), Esmeralda Vizzi (IVIC).

Collaborators
Jeannette Silva (Language and Communication Dept. UC)
Mayra Rebolledo (webmaster)

Style and Writing Editors
Jeannette Silva, Sioly Mora de Orta, Luis Díaz

Referees
Faculty and research member of the Carabobo University and other higher educations institutions.

Honor to whom honor is due. In this section, a biographical outline of the life and work of a relevant person or institution in the biomedical sciences is given.

Letters to the Editor dealing with comments, opinions, questions or criticisms over articles published in the last issue of *Salus* should be sent along with a cover letter addressed to the Editorial Board, signed by the interested party, and sent via internet to the following e-mail address: salus@uc.edu.ve

INSTRUCTIONS TO THE AUTHORS

Manuscripts must be written in a clear, concise language, appropriately used according to the field, and in compliance with the *Salus* format. For this purpose, it is recommended using the guidelines found in: "Requisites of uniformity for manuscripts presented to biomedical journals from the international committee of editors of biomedical journals", available at:

- <http://www.um.es/eglobal/normas/vancouver.pdf>
- <http://www.icmje.org>
- <http://www.revespcardiol.org/sites/default/files/elsevier/NormOrga/025normas.pdf>
- <http://es.scribd.com/doc/54813498/Normas-de-Vancouver>
- http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html or www.icmje.org/

In addition, the authors must comply with the above-mentioned style specifications of *Salus*. Only the authors are held responsible for the opinions, ideas or suggestions appearing in any of the publications. *Salus* will guarantee compliance with the international agreement of Helsinki, and the like, available at:

http://www.fisterra.com/mbe/investiga/declaracion_helsinki.asp

Requirements for submission of papers: Manuscripts submitted for publication must be accompanied by:

1. Cover letter requesting publication, which must be signed by all the authors.
2. A list of the attachments required for acceptance and publication, available at: http://salus-online.fcs.uc.edu.ve/requisitos_salus.pdf signed by the applicant, as well as other documents required for publication in *Salus*.

Spanish is the main language, and English the secondary one.

With the purpose of achieving uniformity in the organization of the content of the articles, authors should comply with the following requirements:

1. Three copies of the manuscript, in letter-size paper; right, upper and lower margins: 2.5 cm; left margin: 3 cm. Pages numbered in the upper right margin, double-spaced; Arial font 12, double spaced, with the exception of the Abstract and References (which are single-spaced).

2. The text will be non-indented, with titles centered in capital boldface, and each section written continuously. Subtitles can be included, when needed. Other types of formats should be approved by the Editorial Board.

3. An electronic version should be included in a CD labeled with the short title, the name of the author of the submission letter and the date. Figures and tables will be included in a separate file.

Maximum length will depend on the type of paper:

Original Article, Essay or Review, 20 pages. **Clinical Case**, 10 pages. **Brief Report**, 5 pages, with a maximum of 2 pages for figures or tables. **Honor to whom honor is due**, 5 pages. **Current Topics or Letters to the Editor**, 2 pages.

4. Reports of experimental or observational studies will have the following sequence and structure: Title, Abstract/key words in Spanish; Title, Abstract/key words in English; Introduction, Materials and Methods, Results, Discussion, Acknowledgements (optional), and References. Subtitles can be included, if needed.

The first page should contain: Title of the paper (boldface, lower case, concise, not exceeding 90 characters). Full name of the authors (boldface, lower case, italics, without professional title or academic degree); name of institution(s) the authors belong to, using consecutive numbers for those of the other authors; information of the author signing the submission letter: name, e-mail address, and cell phone number. Short title (3-6 words) for paper identification should be included.

The second page should contain: Title, Abstract/key words in Spanish and English, without the names of the authors.

Abstract: It must summarize the aim of the work, methods, results and discussion. It should be non-structured and with no references, written in both Spanish and English, including the title, with a maximum length of 250 words, and 3-6 key words in both languages.

For key words in Spanish, the use of BIREME's DeCs, Health Sciences descriptors, is suggested, available at: <http://decs.bvs.br/E/homepage.htm>

For key words in English, the use of Medical Subject Headings (MeSH) is suggested, available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=mesh>

Introduction. A summary of relevant previous work, fundamentals and purpose of the study, with brief references to the topic.

Materials and methods. An accurate description of the subjects of the study, indicating the ethical criteria used; the experimental methods and the statistical analysis tools; the chemicals and equipment used (indicating the fabricant), using International System measuring (IS) Units, available at: (http://es.wikipedia.org/wiki/Unidades_derivadas_del_SI), with their abbreviations. Equations, when used, will be presented in a linear form (e.g.: $m/s^2 = m \cdot s^{-2}$). Thus, the M (molar) must be replaced by mol/L or $mol \cdot L^{-1}$ and mM will be mmol/L.

Results. Report the most relevant information, written in past tense, and presented in a logical order, along with tables and figures. The information contained in tables or figures should not be repeated in the text.

Tables. These should be inserted in the proper place in the text, with brief titles in the upper part, numbered consecutively in Arabic numerals, not repeating information in the text. Vertical lines for separating columns, space bar or tabs should be avoided. Notes regarding information contained in the table should be added at the end, using the corresponding symbols. The decimal mark used in Spanish is a comma (,) and in English, a period (.). In the CD, a separate file will be used for tables.

Figures. Arabic numerals are to be used for numbering, one per page; preferably, in an electronic format, with a caption for figure number (Fig. —), and displaying self-sufficient information, not depending on the text for interpretation.

Photographs. An original and two copies with an adequate contrast for printing should be included with the text, with a short self-descriptive title.

On the backside, the name of the picture, the first author and its place in the text should be written, marking with an "x" the actual upper right angle of the image.

Digital figures or photographs, if any, should maintain the original source file (jpg, gif, tif format). Figures should have a resolution of at least 1200 dpi, and photographs 300 dpi. A separate file in the CD should contain the images.

Sources: It is understood that figures and tables contain original data. Only when taken from a different source, the reference should be included.

Discussion. It highlights novel findings and conclusions of the study. Repetition of the information given in the Introduction, Materials and Methods, and Results sections should be avoided. Findings should be related to other published studies.

Acknowledgements (Optional). Collaborations from people not justifying a co-authorship, or contributions such as academic advice, critical review of the manuscript, data collection, etc., are recognized in this section.

Funding (Optional). In this section, the institution(s) providing funds for the study is/are mentioned.

References. Vancouver guidelines should be used, available at: http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html. Only citations that reinforce or support an idea or finding will be accepted. Correlative numbering with Arabic numerals in parentheses will be used for a citation, according to its first appearance in the text. Citations of: abstracts from scientific meetings, personal communications or papers sent for publication should be avoided.

Journal articles: Last name and initial(s) of the first name. All authors/editors should be included ("and col." will not be accepted). No comma after last name or period between initials. Complete title of article; only the first word of the title and any proper nouns are capitalized. Abbreviated journal title, as indicated in Index Medicus (<http://www.nlm.nih.gov>); year of publication followed by (;), volume followed by (:); hyphenated page numbers (first-last). Example: Vega KJ, Pina I, Krevsky B. Heart transplantation is associated with an increased risk for pancreatobiliary disease. *Ann Intern Med* 1996;124:980-98.

Books and monographs: Last name and initial(s) of first name of all author(s); last name and initial(s) of editors; title of book; edition; publisher; city of publication; year of publication; pages cited (initial-last). Example: Phillips SJ, Whisnant JP. Hypertension and stroke. En: Laragh JH, Brenner BM, editors. Hypertension: pathophysiology, diagnosis and management. 2nd. ed. Raven Press. New York 1995; p.465-478.

Chapters from books: Meltzer PS, Kallioniemi A, Trent JM. Chromosome alterations in human solid tumors. In: Vogelstein B, Kinzler KW, editors. The genetic basis of human cancer. New York: McGraw-Hill; 2002. p. 93-113.

Thesis: González GG. Epidemiología molecular de virus entéricos en niños con diarrea aguda. [Doctoral thesis]. Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC); 2008.

Conference reports: Cárdenas E, Peñaloza S, Urdaneta R, Bonfante-Garrido R. Un estudio seroepidemiológico de la toxoplasmosis en áreas rurales del estado Lara, Venezuela (Abstract). Memorias del XIV Congreso Latinoamericano de Para-sitología, 1999. Acapulco, México. p 21.

Main page of a web site: Only when coming from a government agency or a renown international organization. Name of author(s) or organization, document title, URL address (web page), and date of consultation. *Example:* National Institute

of Health Consensus Development Conference Statement, 1995. Physical Activity and Cardiovascular Health. Available at: <http://www.medscape.com/govNIM/1999/guideline/NIM-card/NIH-card-toc.html>. (Acceso 23 de abril 2000).

Personal communications: All personal communications should be accompanied by a cover letter addressed to Editorial Board and signed by the interested party.

Other types of reference should be consulted at: Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals, 2000. <http://www.icmje.org>

Submission of articles and letters:

Papers should be sent via internet to the “*Comité Editorial de Salus*” at salus@uc.edu.ve, and delivered to the Editorial Office of *Salus* at the following address: Universidad de Carabobo, Facultad de Ciencias de la Salud, Area Básica de Medicina, Dirección de Investigación y Producción Intelectual, Oficina de *Salus*. (al frente de la Escuela de Ingeniería Química), Naguanagua. Estado Carabobo-Venezuela.

Reviewing system: All submissions for publication will be forwarded to the Editorial Board for assessment, in order to verify compliance with the *Instructions to the Authors*. In

case of non-compliance, they will be returned immediately to the author(s). When *Salus* guidelines are met, the Editorial Board will appoint two (2) or more arbiters with expertise in the given field, who will be allowed no more than 30 days for assessing the paper. Once the assessments have been turned in, the Editorial Board will revise the verdicts. The author(s) can only make the corrections suggested by the arbiters or the Editorial Board.

Besides its print publication, *Salus* is also published online at: <http://servicio.bc.uc.edu.ve/fcs/index.htm> or <http://salus-online.fcs.uc.edu.ve/>. (*Salus on line*)

For style issues not mentioned in these guidelines, the Editorial Board will accept the Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals, 2000. Looking over the last issue of *Salus* is recommended to facilitate the organization of a paper.

The Editorial Board reserves the right of accepting or rejecting the submitted papers, and of making the editorial corrections that it deems necessary; in any case, the author(s) will be informed about the cause for rejection or for the need to make changes that will enhance the publication, according to the editorial policy of the Journal. *Salus* will not be responsible for the views expressed by the author(s) in the papers accepted for publication, nor supportive of them.

Salus

NORMAS PARA LOS ÁRBITROS

Revista *Salus*

El **Comité Editorial** verificará si el manuscrito se ajusta a las normas respectivas incluidas en la Política General de la Revista.

El **Comité Editorial** mantendrá la confidencialidad de autores y árbitros, y designará al menos dos evaluadores expertos para revisar el manuscrito.

El **Comité Editorial** establecerá la normativa aplicada, que servirá de guía para el proceso de evaluación del artículo. Al respecto los árbitros designados deberán tomar en cuenta las siguientes consideraciones:

- Importancia de la temática abordada.
- Originalidad.
- Enfoque o diseño metodológico.
- Resultados precisos y claramente presentados.
- Pertinencia de la discusión.
- Adecuación de las conclusiones con el propósito de la investigación.
- Organización adecuada.
- Normas de presentación adaptadas a la política general de la revista.
- Título que exprese el propósito de la investigación.
- Extensión del artículo.
- Bibliografía adecuada, actualizada y citada correctamente.
- El dictamen del árbitro concluirá en recomendar si el trabajo puede ser publicado: 1) Sin modificaciones, 2) Con modificaciones mayores (regresa a los autores), 3) Con modificaciones menores, 4) No se sugiere su publicación.

FUNCIONES DEL ÁRBITRO

- Conocer la Política Editorial, Normas y Requisitos de publicación de la Revista.
- Revisar integralmente contenido y forma de los manuscritos sometidos a su consideración.
- Proponer las modificaciones u observaciones necesarias de acuerdo a su experticia, compatibles con la Política General de la Revista y enviarlas en comunicación escrita al Comité Editorial, anexando la hoja de evaluación del artículo.
- Requerir el cumplimiento de las normas éticas en los trabajos sometidos a su evaluación.
- Cumplir con el plazo estipulado por la revista para la evaluación de los artículos (un mes a partir de la fecha de recibo).
- Avisar de manera oportuna sobre posibles retrasos en la evaluación del artículo.
- Mantener confidencialidad, en caso de conocer la identidad de los autores. Evitar comentar o discutir con ellos su criterio y/o sugerir directamente modificaciones al artículo.

GUIDELINES FOR REVIEWERS

Salus Journal

The **Editorial Board** will verify whether the manuscript complies with the Instructions to the Authors contained in the journal's General Policies.

The **Editorial Board** will keep confidentiality of authors and reviewers, and will appoint at least two expert reviewers for assessing the manuscript.

The **Editorial Board** will establish the guidelines for assessing journal articles. Thus, the appointed reviewers should take into account the following aspects:

- Importance of the topic studied.
- Originality.
- Methodological approach or design.
- Accurate and clearly presented results.
- Pertinent discussion.
- Conclusions in agreement with the purpose of the research.
- Proper organization.
- Presentation guidelines in accordance with the journal's General Policies
- Title stating the purpose of the study.
- Length of the article.
- Current, pertinent bibliographic references using Vancouver guidelines for citations.

The reviewer recommendations on the paper may be one of the following: 1) Publication with no changes, 2) Publication with major changes, 3) Publication with minor changes, 4) Publication not recommended.

DUTIES OF REVIEWERS

- To be acquainted with the Editorial Policies, and publication guidelines and requirements of the journal.
- To thoroughly review the content and form of all manuscripts submitted for assessment.
- To suggest needed changes or remarks, based on his/her professional expertise, and in agreement with the journal's General Policies, and to forward them to the Editorial Board in a written communication, attaching the assessment sheet of the paper.
- To ensure that manuscripts submitted for assessment comply with ethical norms.
- To comply with the time period established by the journal for assessing papers (one month from the date of reception).
- To notify promptly of any possible delays in the assessment of papers.
- To keep confidentiality.

SOLICITUD DE PUBLICACIÓN Y CONSTANCIA DE PARTICIPACIÓN

Ciudadanos
 Director Editor y demás Miembros del Comité Editorial
 Revista Salus
 Presente.-

Por medio de la presente envío a Ud. (s) el manuscrito del trabajo titulado: ".....", para que sea sometido a evaluación para la publicación. Manifiesto que son autores y coautores de este trabajo los que figuran en la tabla, habiendo tenido la participación que se indica en la misma: a) Concepción y diseño; b) Recolección y/o obtención de resultados; c) Análisis de los datos; d) Redacción del manuscrito; e) Aprobación de versión final; f) otros (indicar cuál)

Que este trabajo no ha sido publicado, no es duplicado ni redundante, ni ha sido sometido a arbitraje para su publicación por ningún medio de difusión, que los datos son originales y verídicos, que el autor y los coautores ceden los derechos de autor a la revista *Salus*, que el trabajo, tanto en su texto como las tablas y figuras ha sido elaborado de acuerdo a las Instrucciones para los Autores, publicadas por Salus, que las referencias son directamente relacionadas con el trabajo y que el orden de crédito es el que figura en el original adjunto.

Se designa como autor de correspondencia al autor o coautor que figura abajo, con quien el Comité Editorial mantendrá comunicación a través del correo electrónico indicado, que será responsable ante autores y coautores y dará respuesta rápida a los requerimientos del Comité Editorial. No se conocen conflictos de intereses y de haberlos los autores y coautores están obligados a indicarlo en el original junto a la fuente de financiamiento.

Nombre	Participación (colocar solo la letra)	Firma

Atentamente,

.....

Firma

.....

Fecha de consignación

Nombre del Autor de correspondencia:

E- mail..... Teléfono.....

Afiliación (Instituto, Centro, Hospital, etc.)

REQUISITOS DE LA REVISTA *Salus* PARA RECEPCIÓN DE TRABAJOS QUE SERÁN SOMETIDOS A CONSIDERACIÓN DEL COMITÉ EDITORIAL

1. (Marque la opción según corresponda)

Tipo de Artículo:

- ARTICULO ORIGINAL (Máximo 20 páginas).
- ARTICULO DE REVISIÓN (Máximo 20 páginas).
- ENSAYO (Máximo 20).
- CASO CLÍNICO (Máximo 10 páginas).
- NOTA BREVE (Máximo 5 páginas, incluyendo 2 figuras o tablas).
- HONOR A QUIEN HONOR MERECE (Máximo 5 páginas). Por invitación del Comité Editorial.
- TÓPICOS DE ACTUALIDAD (Máximo 2 páginas). Por invitación del Comité Editorial.
- CARTAS AL EDITOR (Máximo 2 páginas).

2. Haga una marca en la columna de la derecha si ha cumplido con el requisito.

REQUISITOS PARA PUBLICACIONES DE LA REVISTA <i>Salus</i>	CUMPLE
CARTA DE SOLICITUD DE PUBLICACIÓN Y CONSTANCIA DE PARTICIPACIÓN.	
TÍTULO DEL TRABAJO (En minúscula, negritas y máximo 90 caracteres).	
TÍTULO CORTO PARA IDENTIFICAR EL TRABAJO (Máximo 6 palabras).	
NOMBRE Y APELLIDO DE TODOS LOS AUTORES.	
INSTITUCIÓN DE ADSCRIPCIÓN DE LOS AUTORES (Dirección completa).	
NOMBRE, APELLIDO Y DIRECCIÓN ELECTRÓNICA DEL AUTOR DE CORRESPONDENCIA (Con quien se comunicará el Comité Editorial).	
RESUMEN (Máximo 250 palabras).	
PALABRAS CLAVE (De 3 a 6).	
TÍTULO DEL TRABAJO EN INGLÉS.	
ABSTRACT (Máximo 250 palabras).	
KEY WORDS (De 3 a 6).	
REFERENCIAS (Siguiendo las Normas Vancouver y con enlaces activos en la web)	
AGRADECIMIENTOS (Opcional).	
FINANCIAMIENTO (Opcional).	
TABLAS REALIZADAS DE ACUERDO A INSTRUCCIONES (En formato tabla Word)	
FIGURAS REALIZADAS DE ACUERDO A INSTRUCCIONES.	
CONSIGNACIÓN DE 3 COPIAS IMPRESAS DEL ARTICULO	
VERSION ELECTRÓNICA EN CD (Identificando título corto, autor de correspondencia, fecha)	