

raro encontrar pacientes en la fase aguda de la enfermedad. Los millones de pacientes ya infectados por *Trypanosoma cruzi*, a menos que surja una medicación específica más eficaz, seguirán su evolución. Y el número de chagásicos asintomáticos, proporcionalmente, será cada vez menor.

Los pacientes chagásicos deben ser atendidos básicamente por médicos generales, una minoría por especialistas. Para una correcta atención del paciente, es imprescindible que el médico general conozca la evolución de la enfermedad en su área geográfica y sepa cuando necesita del auxilio de especialistas. La mayoría de los pacientes son de origen rural, viven en zonas periféricas de las ciudades, tienen un bajo nivel cultural y cerca del 70% trabaja como braceros.

Los pacientes chagásicos llegan a la consulta médica quejándose de disnea u otros síntomas de insuficiencia cardíaca, pérdida de conciencia y otras manifestaciones de reducción del débito cardíaco, disfagia o constipación prolongada. Otras veces llegan por el hallazgo casual de serología positiva para enfermedad de Chagas o electrocardiograma anormal. En cualquiera de estas circunstancias, cabe al médico confirmar el diagnóstico etiológico, lo que generalmente es hecho por la repetición de la serología a través de más de una técnica serológica.

Confirmado el diagnóstico etiológico, el médico definirá la forma clínica de la enfermedad tomando en consideración, lógicamente, que no todas las quejas presentadas por un paciente con serología positiva son debidas a la enfermedad de Chagas. En esta etapa la atención del paciente, además del examen clínico, incluye

electrocardiograma convencional, teleradiografía de tórax, examen radiológico del esófago y del intestino grueso. Si los resultados de estos exámenes fueron normales el paciente es considerado como teniendo la forma indeterminada de la enfermedad y no hay necesidad de solicitarle otros exámenes.

Establecida la forma clínica de la enfermedad el médico necesita conocer la extensión de las lesiones, correlacionándolas con la sintomatología. En la cardiopatía habrá que analizar el estado evolutivo en que se encuentra. En la esofagopatía o colopatía habrá que determinar si hay dilatación del órgano y en que grado. Dependiendo de las circunstancias y disponibilidad de recursos pueden solicitarse otros exámenes.

Una vez establecido el grado de daño causado por la infección del *T. cruzi* se evalúa el pronóstico y se establece una conducta a seguir.

El médico general debe decidir, en cualquier etapa de la infección, sobre la conveniencia de hacer el tratamiento específico, tomando en consideración la toxicidad y en ciertas condiciones la poca eficacia de los medicamentos disponibles.

Desde el punto de vista práctico, en los pacientes con la forma indeterminada de la enfermedad, habrá que solicitar electrocardiograma y estudio radiológico del corazón, esófago e intestinos después de cinco años. En este período, el paciente no necesita restringir sus actividades.

En las formas avanzadas de la enfermedad es necesario el tratamiento sintomático, cuidados generales y puede ser necesario el consejo y la orientación de especialistas.

MESAS REDONDAS: MR

Señales intracelulares en *T. cruzi* y Leishmania

MR1. Rol del calcio en la virulencia y sobrevivencia de parásitos intracelulares. ROBERTO DOCAMPO.

Laboratory of Molecular Parasitology, Dept. of Pathobiology, University of Illinois at Urbana-Champaign, 2001 South Lincoln Avenue, Urbana, IL 61802, USA.

Muchos parásitos deben invadir células huésped para poder replicarse. Los cambios que ocurren en la concentración intracelular de Ca^{2+} cuando diferentes parásitos y células de cultivo de tejido se ponen en contacto han sido estudiados por varios autores (1). Un aumento de Ca^{2+} citosólico ocurre en las células huésped cuando entran en contacto con trypomastigotes de *Trypanosoma cruzi*, amastigotes de *Leishmania donovani*, o merozoitos de *Plasmodium falciparum* (1). Nosotros hemos descrito que también ocurre un aumento en la concentración citosólica de Ca^{2+} libre ($[Ca^{2+}]_i$) en los trypomastigotes de *T. cruzi* durante la invasión de células huésped (2). Cuando se previene este aumento transitorio de Ca^{2+}

con quelantes intracelulares, se observa una disminución de la invasión de las células huésped por estos parásitos (2). También hemos estudiado los cambios de $[Ca^{2+}]_i$ que ocurren cuando clones virulentos y no virulentos de *L. amazonensis* interactúan con macrófagos (3). Nuestros resultados indican que más Ca^{2+} liberable es almacenado en amastigotes virulentos que en promastigotes virulentos o en formas avirulentas de ambos estadios. Esta mayor cantidad de Ca^{2+} liberable se correlaciona con la presencia de señales de Ca^{2+} en los amastigotes virulentos durante la invasión de macrófagos. Las señales de Ca^{2+} y la invasión de las células huésped son reducidas cuando los parásitos se incuban previamente con quelantes intracelulares de Ca^{2+} (BAPTA/AM, Quin 2/AM) pero no con análogos estructurales no quelantes de Ca^{2+} (semi-BAPTA/AM). Un gen que codifica una Ca^{2+} -ATPasa de tipo organelar de *L. amazonensis* fue clonado y secuenciado. Se encontró una mayor expresión de este gen en amastigotes virulentos en comparación con todas las otras formas.

Como ocurre en otros tripanosomatídeos, las leishmanias poseen la mayor parte de su Ca^{2+} intracelular en un compartimiento ácido denominado acidocalcisoma. La caracterización bioquímica de estas

organelas ha determinado que son acidificadas por la acción de una ATPasa protónica de tipo vacuolar y que poseen además una Ca^{2+} -ATPasa para la incorporación de Ca^{2+} . Los acidocalcisomas han sido encontrados en los diferentes estadios de *T. cruzi* (4), *T. brucei* (5-7), y *L. amazonensis* (3) y aparentemente no tienen equivalente en células animales. El uso de congelamiento rápido, ultracriomicrotoma y análisis elemental por rayos X permitió estudiar la composición de estas organelas en *T. cruzi*. Los acidocalcisomas son ricos en calcio, magnesio, fósforo, sodio y zinc (8). Fraccionamientos subcelulares y estudios de co-localización de la ATPasa protónica de tipo vacuolar y de una Ca^{2+} -ATPasa, que también fue clonada, secuenciada y expresada, dieron evidencias de que estas organelas son únicas y diferentes de los lisosomas o reservosomas (8). Tanto los amastigotes de *T. cruzi* como los de *L. amazonensis* poseen un mayor contenido de Ca^{2+} en sus acidocalcisomas lo que sugiere un mecanismo de adaptación al medio intracelular. En conclusión, estos resultados demuestran una correlación entre la expresión de Ca^{2+} -ATPasas, el contenido de Ca^{2+} intracelular, las señales de Ca^{2+} y la virulencia de parásitos intracelulares.

1. Docampo, R., and Moreno, S.N.J. (1996) *Parasitology Today*, 12, 61.
2. Moreno, S.N.J., Silva, J., Vercesi, A.E., and Docampo, R. (1994) *J. Exp. Med.*, 180, 1535.
3. Lu, H.G., Zhong, L., Chang, K.P., and Docampo, R. (1997) *J. Biol. Chem.* 272, 9646.
4. Docampo, R., Scott, D.S., Vercesi, A.E., and Moreno, S.N.J. (1995) *Biochem. J.*, 310, 1005.
5. Vercesi, A.E., Moreno, S.N.J., and Docampo, R. (1994) *Biochem. J.*, 304, 227.
6. Scott, D.A., Moreno, S.N.J., and Docampo, R. (1995) *Biochem. J.*, 310, 780.
7. Vercesi, A.E., and Docampo, R. (1996) *Biochem. J.*, 315, 265.
8. Scott, D.A., Docampo, R., Dvorak, J.A., Shi, S., and Leapman, R.D. (1997) *J. Biol. Chem.*, en prensa.

MR2. Compromiso de fosfolípidos y fosfolipasas durante la interacción del *Trypanosoma cruzi* y membranas biológicas. LUJÁN, H.D.¹; RACAGNI, G.², GARRIDO, M.²; PEREIRA, B.M.I.¹; RODRÍGUEZ, M.¹; MACHADO-DOMENECH, E.E.²; BRONIA, D.H.¹.

¹Universidad Nacional de Córdoba, CC 35, Suc. 16. CP 5016. Córdoba. ² Universidad Nacional de Río Cuarto. CP 5800. Córdoba, Argentina.

Luego del contacto inicial con células de mamíferos, el *Trypanosoma cruzi* activa una serie de mecanismos que resultan en su internalización en la célula huésped. Poco se conoce acerca de cómo el parásito responde a ese contacto e induce la fusión de lisosomas con la membrana plasmática para iniciar la formación de la vacuola parasitófora en la célula huésped. Aunque los eritrocitos humanos no son invadidos por el *T. cruzi* *in vivo*, el uso de estas células nos ha permitido determinar cambios bioquímicos que ocurren en las mismas y en el *T. cruzi* durante su interacción

in vitro. Demostramos así que el *T. cruzi* induce la desestabilización de la membrana plasmática de los eritrocitos causando lisis o fusión de los mismos dependiendo de la concentración de calcio en el medio. Este fenómeno se correlaciona con un notable incremento de ácidos grasos libres y lisofosfolípidos en las membranas del eritrocito, los cuales se generan en el parásito y se transfieren a la célula blanco durante la interacción. Además, el pretratamiento del parásito con inhibidores de fosfolipasas A2 (PLA2) suprimió los cambios morfológicos y bioquímicos observados. El contacto célula-parásito también promovió un importante aumento en el número de recambio de algunos fosfolípidos del *T. cruzi* en presencia o ausencia de calcio. Estos resultados podrían implicar la participación de más de una fosfolipasa en la invasión del parásito o en la recepción del estímulo del contacto. Las PLA2s han sido comprometidas además en la penetración de otros importantes parásitos intracelulares, como *Toxoplasma gondii* y *Plasmodium sp.* Sin embargo, la purificación y/o caracterización bioquímica y genética de estas enzimas no ha sido estudiada en ningún protozoo. Utilizando métodos bioquímicos e inmunológicos identificamos actividades de PLA1 y PLA2 en el *T. cruzi*. Actividad de PLAs se detectó por fluorometría y radiometría y la identificación de PLA2 secretoria (14 kDa) y citosólica (85 kDa) se llevó a cabo utilizando anticuerpos contra enzimas heterólogas. Estos resultados sugieren que fosfolipasas, especialmente del tipo A2 y fosfolípidos de *T. cruzi* participan activamente en eventos relacionados al proceso de interacción del parásito a la célula huésped.

MR3. Quinasas de proteínas y división celular en *Trypanosoma cruzi* MARÍA TERESA TÉLLEZ-ÍNÓN.

INGEBI-CONICET y Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, UBA. Buenos Aires, Argentina.

Las proteínas quinasas son importantes en la regulación de muchos procesos celulares, entre otros los relacionados con el crecimiento y la diferenciación celular. Nuestro laboratorio describió en *Trypanosoma cruzi* varios miembros de la familia de quinasas de proteínas, reguladas por segundos mensajeros como proteína quinasa activada por adenosina monofosfato cíclico, PKA, proteína quinasa C y la dependiente de Ca^{2+} /calmodulina. Estas enzimas presentan propiedades similares a las quinasas de eucariotes superiores.

Con el interés de relacionar el camino de transducción de señales con la división celular, se estudiaron quinasas de proteínas involucradas en este proceso. Se clonaron dos genes denominados *tkr1* y *tkr2*, correspondientes a quinasas relacionadas a *cdc2*, *CRK*, que presentan un alto porcentaje de identidad con genes clonados en otros tripanosomátidos. *tkr1* codifica para una proteína de 35 kDa que posee 51,5% de identidad en amino ácidos con *cdc2* humana, y 82% de identidad con *CRK3* de *T. brucei*. *tkr2* codifica para una proteína de 33 kDa, que posee 52,7% de identidad con