

CONFERENCIAS: CO

CO1. Genoma del *Trypanosoma cruzi*. ANDRÉS M. RUIZ Y JACQUELINE BUA.

*Instituto de Parasitología Dr. Mario Fatała Chabén.
Buenos Aires, Argentina.*

El proyecto "Genoma del *Trypanosoma cruzi*" fue una iniciativa de la Organización Mundial de la Salud, TDR (Special Programme for Research in Tropical Diseases) cuyo objetivo es la secuenciación completa del genoma del parásito permitiendo el conocimiento de la estructura de las moléculas involucradas en la infección y así identificar posibles blancos de ataque para su destrucción, a través de una quimioterapia y/o una inmunoprofilaxis efectiva. Los laboratorios que intervienen en este emprendimiento conjunto son 20; tres de los cuales pertenecen a Argentina, 9 a Brasil y Venezuela, y 1 a E.E.U.U. En Europa se encuentran involucrados 7 laboratorios, en Alemania, España, Francia, Reino Unido y Suecia. Se establecieron redes de trabajo en las que se ha cumplido una fundamental tarea de generar bibliotecas genómicas de grandes fragmentos de ADN, otras de ADN copia y distribuir el material entre los laboratorios interesados. La amplia heterogeneidad del *T. cruzi* en cuanto a sus propiedades biológicas motivó la elección de un único organismo de estudio y referencia para toda la red involucrada en el estudio el genoma. El clon elegido fue CL Brener, deriva de la cepa CL, aislada de un *Triatoma infestans*. Esta clon presenta las características más representativas del parásito. Nuestro laboratorio participa en este proyecto con la caracterización del cariotipo molecular a través de marcadores cromosomales y con el mapeo físico y transcripcional del genoma completo del parásito.

Caracterización del cariotipo molecular a través de marcadores cromosomales: Debido a que el material genético del *T. cruzi* se organiza en cromosomas pequeños que no condensan durante la división celular, su estudio por técnicas convencionales en citogenética no es posible, pero sí lo es mediante la separación del genoma en bandas cromosomales por electroforesis en campo pulsado. El tamaño del genoma y número de bandas cromosomales varía de una cepa a otra del *T. cruzi*. Al comienzo de este proyecto, se estimó en 55 megabases el tamaño del genoma del *T. cruzi*, pero estimaciones más recientes aproximan el genoma a un tamaño entre 80 y 100 Mb. Para el análisis y visualización de diferentes rangos de bandas cromosomales se deben utilizar diferentes condiciones de separación para resolver apropiadamente la separación de los cromosomas más pequeños, intermedios y los de mayor tama-

ño. En un estudio en que se ensayaron 13 condiciones de separación de cromosomas se encontraron diferentes patrones de migración de bandas cromosomales entre los clones CL Brener, CA-I/72 y Sylvio X10/7, siendo los cromosomas de CL Brener más grandes en general que en los otros clones estudiados. El número de cromosomas estimados es de al menos 64, la mayoría de estos representados como cromosomas homólogos. Cuando estas electroforesis en campo pulsado fueron transferidas a filtros de nylon y se analizaron mediante hibridación con 35 marcadores específicos, se observó que 30 de ellos reconocieron cromosomas únicos. Las sondas específicas para cromosomas identificaron entre 26 y 31 bandas cromosómicas en los tres clones estudiados, correspondiendo a 20 cromosomas únicos en CL Brener y 19 en CA-I/72 y Sylvio X10/7. Algunos marcadores mostraron grupos de conexión entre sí y se identificaron 9 diferentes grupos conectados, cada uno comprendiendo de 2 a 4 marcadores. Este estudio se realizó en 26 diferentes cepas y clones del parásito. Aproximadamente el 50% de los cromosomas del parásito han sido identificados por marcadores lo que implica que falta obtener otros marcadores específicos, probablemente provenientes de EST (expressed tagged sequences) que definan cromosomas no caracterizados aún. También en este estudio se confirmó que el ADN repetitivo era más abundante en el clon CL Brener que en los otros clones estudiados. Este hecho implica una gran desventaja en la elección de este clon para su mapeo y secuenciación, debido a la redundancia del material a analizar.

Mapeo físico y transcripcional del genoma del *T. cruzi*: Hemos comenzado el mapeo del genoma del *T. cruzi*, a nivel del clonado de cósmidos. Se está analizando una biblioteca genómica del parásito construida a partir de ADN genómico del clon CL Brener, en el cósmido modificado Lawrist 7. La «library» resultante consistió en 36.864 clones primarios individuales de un promedio de 37 Kb. La representación de la library es de 25 equivalentes genómicos del parásito y fue realizada por el Dr. Joerg Hoheisel, del laboratorio de Análisis de Genomas, Heidelberg, Alemania. El desarrollo que ha alcanzado la aplicación de las técnicas de hibridación ha posibilitado el análisis detallado de extensas regiones de diferentes genomas como también de genomas completos. Las hibridaciones permiten un examen paralelo de un gran número de clones y la posibilidad de ubicar los clones de la library en filtros de alta densidad permite una caracterización inequívoca de cada clon positivo («fingerprinting») como se requiere para

ensamblar un mapa. El objetivo de esta parte del trabajo es ordenar la genoteca de cósmidos mediante un análisis por «fingerprinting» en un mínimo conjunto de clones que superpongan secuencias de ADN («contigs») para obtener un mapa de alta resolución que permita la localización física de marcadores genéticos. Dado que el genoma del *T. cruzi* es de 80 a 100 Mb, la library de contigs tiene un inserto promedio de 37 Kb, que cada cósmido debe ser hibridizado por lo menos 3 veces por una sonda y que se usan pooles de 12 sondas para hibridar la library completa, el cálculo del número de hibridaciones que son necesarios para obtener un mapa confiable del parásito es de aproximadamente 1100. Diferentes estrategias han sido utilizadas hasta el momento para hibridar la library de cósmidos. Se realizaron 70 hibridaciones con pooles de 12 y de 24 clones de cósmidos y unas 200 hibridaciones con pooles de 12 clones de ADNc amplificados por PCR. Las hibridaciones con clones de ADNc muestran una disminución del ruido de fondo respecto de los cósmidos marcados y a partir de estos resultados se decidió utilizar esta library de ADNc, normalizada, construida por el Dr. Edson Rondinelli, del Instituto de Biofísica Carlos Chagas, Universidad de Río de Janeiro, para generar las sondas por PCR. Los resultados de las hibridaciones, que son exposiciones a filmes radiográficos, han sido leídos manualmente. Los clones positivos se analizaron por programas escritos especialmente para el análisis de genomas y procesados en un equipo SUN SPARC-II en Heidelberg, Alemania. La obtención del mapa físico del *T. cruzi* será un logro fundamental para apoyar los posteriores proyectos de secuenciación de bases del ADN del parásito, evitando la redundancia de secuencias en regiones de ADN presentes en los cósmidos que superponen información. Los datos que el proyecto genoma del *T. cruzi* genera, pueden ser consultados en la base de datos disponible en la página de Internet: <http://www.dbbm.fiocruz.br/genome/tcruzi/tcruzi.html>, coordinada por el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Fundación Osvaldo Cruz, en Río de Janeiro. La misma contiene datos parasitológicos y biológicos de la cepa de referencia, todas las secuencias del *T. cruzi* provenientes de bancos de datos y las generadas por este proyecto, datos de las bibliotecas disponibles, listas de actividades y los grupos participantes.

CO2. Strategies to develop trypanocidal drugs. LEOPOLD FLOHÉ.

Department of Physiological Chemistry, Technical University Braunschweig, Mascheroder Weg 1, D-38124 Braunschweig.

Presently available treatments for trypanosomal infections can not be rated as satisfying in terms of efficacy and safety. In view of the impressive numbers of affected patients novel approaches to specifically attack the parasites deserve serious considerations.

The strategic dream in the development of any anti-infectious drug is to block a metabolic pathway which is unique and vital to the parasite and virtually absent or unimportant in the host. This goal has so far been met only with the β -lactam antibiotics affecting the biosynthesis of bacterial cell walls. Unfortunately, the metabolic potential of eukaryotic parasites such as *Trypanosoma* and *Leishmania* species is much closer to that of the host than in the case of bacteria. The choice of specific therapeutic targets is correspondingly difficult.

Peculiar to the trypanosomatids is the transformation of glutathione into the derivative N¹,N⁸-bis(glutathionyl) spermidine, a compound never detected in any species outside this family of parasites and called trypanothione (1). Although the essentiality of trypanothione for the survival of the parasite has not yet been strictly proven, it is generally accepted that trypanothione there substitutes for glutathione. At least trypanothione appears solely responsible for the oxidant defence system of *trypanosomatidae*, since glutathione-utilizing peroxidases and catalase are absent. Correspondingly the enzymes synthesizing and utilizing trypanothione have for long been discussed as a potential target for the development of trypanocidal drugs. In fact, the redox cyclizer nifurtimox may be listed as an example of an existing drug making use of the relative inefficiency of the trypanothione-dependent peroxide removal system, trypanocidal arsenicals have been discussed to block trypanothione and difluormethylornithine is considered to interfere with trypanothione regeneration at the level of spermidine biosynthesis. Unfortunately, all these therapeutic options suffer from lack of specificity.

A selective attack on the parasite may instead be expected from specific inhibition of any kind of enzyme building or using trypanothione. Out of these trypanothione reductase has attracted considerable interest as a potential drug target and the availability of pertinent structural data facilitates the design of specific inhibitors (2). Alternatively, the key enzyme of the two-step biosynthesis of trypanothione, glutathionyl-spermidine synthetase may be considered as an attractive candidate, since sequencing data do not reveal any homology to known host proteins (3). Finally, the two recently described proteins tryparedoxin and tryparedoxin peroxidase which, acting in concert, constitute the trypanothione peroxidase activity in trypanosomatids offer additional chances. Although they are homologous to mammalian proteins, i.e. to thioredoxin and the peroxiredoxins, respectively (4), they appear sufficiently distinct to allow reasonable hopes for the design of specific inhibitors.

References:

1. Fairlamb, A.H., Cerami, A. (1992) Ann. Rev. Microbiol. 46, 695-729.
2. Jacoby, E.M., Schlichting, I., Lantwin, C.B., Kabsch, W., Krauth-Siegel, R.L. (1996) Proteins 24, 73-80.
3. Koenig, K., Menge, U., Kieb, M., Wray, V., Flohé, L. (1997) J. Biol. Chem. 272, 11908-11915.
4. Nogoceke, E., Gommel, D.U., Kieb, M., Kalisz, H.M. (1997) Biol. Chem. Hoppe-Seyler 378, 827-836.

CO3. Regulación de la respuesta inmune e inmunopatología en la esquistosomiasis murina experimental. MIGUEL J. STADECKER.

Departamento de Patología, Tufts University School of Medicine, Boston, USA.

La esquistosomiasis es una enfermedad parasitaria sufrida por más de 200 millones de personas en regiones tropicales del planeta. En particular, la esquistosomiasis causada por el helminto *Schistosoma mansoni* consiste en la formación de granulomas hepáticos e intestinales alrededor de los huevos del parásito. En la mayoría de los pacientes la enfermedad es crónica y compatible con una vida relativamente normal, pero en una minoría del 5 al 10%, el proceso inflamatorio conduce a fibrosis hepática, hipertensión portal, hemorragia gastrointestinal y muerte. A pesar de que la esquistosomiasis es una enfermedad prevenible y curable, los casos nuevos registrados, paradójicamente, van en aumento. Los intentos de producir una vacuna contra el verme mismo hasta ahora no han dado resultado. Nuestro laboratorio se dedica a entender la base inmunológica de la respuesta patogénica hacia el huevo del parásito, y cómo ésta puede reducirse con miras de prevenir o mejorar el cuadro clínico de la enfermedad, un concepto que se conoce con el nombre de "vacuna antipatología".

Durante estas últimas décadas los estudios inmunológicos en esquistosomiasis han avanzado considerablemente mediante el uso de un modelo experimental en el ratón, que presenta un cuadro inmunopatológico de gran similitud al humano. El modelo murino permitió descubrir que la inflamación granulomatosa perioval hepática es vigorosa en la fase aguda de la enfermedad, pero que rápida y espontáneamente sufre una reducción de intensidad. Este fenómeno, que hoy se denomina "inmunomodulación", y que también existiría en el humano, sería responsable de atenuar el grado de severidad de la enfermedad en la gran mayoría de los pacientes, y no funcionaría en aquellos que sufren de su forma grave y fatal.

Se sabe a ciencia cierta que la patología que resulta de la infección por esquistosomas es mediada por linfocitos T helper (Th) CD4 positivos que expresan receptores para antígeno (TCR) de tipo $\alpha\beta$ y que son específicos para antígenos del huevo. Esto quedó claramente demostrado gracias a la existencia de ratones portadores de mutaciones delecionales de moléculas MHC y de TCR. También se sabe que los linfocitos Th CD4 positivos son estimulados en presencia de una señal primaria compuesta por un péptido situado en una molécula MHC de clase II, además de señales secundarias co-estimuladoras, después de lo cual proliferan clonalmente, producen citoquinas y generan células efectoras y de memoria. En ausencia de señales co-estimuladoras, como aquellas conferidas por el sistema B7, estos linfocitos no dan respuesta y pueden entrar en un estado de anergia. Lo que sigue siendo motivo de debate es la contribución relativa de las dos sub-poblaciones principales de linfocitos Th CD4 positivos en mediar dicha patología: por un lado están los de tipo Th-1, que producen IL-2 e interferón gamma, y que están a cargo de fenómenos

relacionados a la inmunidad celular, y por el otro, los de tipo Th-2, que producen IL-4, IL-5 e IL-10, y que fomentan la inmunidad humoral estimulando a los linfocitos B a producir anticuerpos.

Hace ya tiempo que nuestro laboratorio demostró claramente que clones de linfocitos Th-1 específicos para antígenos del huevo son capaces de mediar granulomas y postuló que estos linfocitos son críticos en la fase inicial de formación de los granulomas vigorosos, dado que se detectan las citoquinas correspondientes *in vitro*. Sin embargo, estos linfocitos Th-1 disminuyen con el correr de la enfermedad aguda, al mismo tiempo que empiezan a aumentar las citoquinas de tipo Th-2. La base de este cambio de Th-1 a Th-2 ha sido sujeto a un análisis en el que se comprobó que durante el transcurso de la enfermedad aguda existe un incremento de la IL-10 y una reducción de expresión de moléculas de co-estimulación de tipo B7 en células accesorias, como por ejemplo los macrófagos en el granuloma. Estas observaciones dieron origen a la hipótesis de que la pérdida de moléculas co-estimuladoras conferiría a las células presentadoras de antígeno un fenotipo capaz de inducir anergia en lugar de estimular a las células Th-1, de esta manera reduciendo un componente patogénico crítico de la enfermedad. En cambio, las células Th-2, menos dependientes para su mantenimiento de las moléculas B7 de co-estimulación, seguirían intactas, asegurando la persistencia de anticuerpos y de eosinófilos. Queda aún por resolver si los linfocitos Th-2 son capaces *per se* de mediar granulomas. Aunque experimentos iniciales utilizando líneas celulares definidas para reconstituir a ratones inmunodeficientes parecen decir que no, este tema merece más investigación.

Este esquema de eventos relacionados a la inducción y regulación de la respuesta inmune e inmunopatología en la esquistosomiasis ha sido avalado por observaciones experimentales y clínicas. Por ejemplo, en el terreno experimental, la administración de una proteína de fusión de IL-10 reduce la inflamación granulomatosa. Por otro lado estudios clínicos en Brasil, Egipto e India han demostrado que formas clínicas graves de esquistosomiasis (y de filariasis) están asociadas con un aumento de expresión de moléculas B7 y con citoquinas de tipo Th-1, mientras que en las formas benignas de la enfermedad ocurre lo contrario y existe una elevación de la IL-10. Recientemente la relevancia del sistema B7 de co-estimulación en la patogenia de los granulomas se puso de manifiesto cuando se demostró que en ratones que carecen de dichas moléculas los granulomas son menores que en los controles.

Aunque la respuesta granulomatosa es una consecuencia de la activación de linfocitos Th CD4 positivos específicos, existen factores genéticos que la regulan. Tal es así que ratones de la cepa C3H hacen granulomas grandes, mientras que los C57BL/6 hacen granulomas más pequeños. Por otra parte, hemos observado que linfocitos mesentéricos de los ratones C3H montan respuestas proliferativas importantes contra un antígeno mayoritario del huevo denominado Sm-p40, en tanto que en los C57BL/6 la respuesta es marcadamente menor. Aún más, todos los miembros de un panel de

hibridomas T monoclonales específicos para antígenos del huevo que hemos derivado a partir de ratones C3H infectados, o inmunizados con una preparación soluble de dichos antígenos, respondieron exclusivamente al Sm-p40. En cambio, ninguno de los hibridomas C57BL/6 correspondientes respondió a este antígeno. Estudios adicionales demostraron que la respuesta de células T contra el Sm-p40 es invariable de tipo Th-1 y es restringida por H-2^k.

Estos hallazgos parecen indicar que el reconocimiento de antígenos principales del huevo puede correlacionarse directamente con el grado de patología resultante, y sugieren que la inducción de tolerancia en los linfocitos T correspondientes podría menguar dicha patología. La posibilidad de reducir patología por medio de antígenos específicos es el objetivo de la mencionada "vacuna anti-patología". Para tal fin, es necesaria la identificación y análisis de estos antígenos. En el caso del antígeno Sm-p40, nuestro laboratorio ya ha identificado la posición del epítipo T dominante y ha construido el péptido mínimo portador de dicho epítipo. Además se están identificando otros antígenos del huevo reconocidos por hibridomas T. Una vez identificados y clonados los antígenos/péptidos principales con los correspondientes epítopos dominantes, éstos deberán ser administrados apropiadamente para inducir tolerancia efectiva en los linfocitos T, y consecuentemente disminuir la severidad de la inmunopatología.

En resumen, los estudios experimentales descriptos han arrojado información básica importante sobre la respuesta inmunopatogénica en la esquistosomiasis y su regulación, a partir de los cuales se abren oportunidades prácticas para disminuir la incidencia o gravedad de la enfermedad. Estas consistirán principalmente en ensayar la efectividad de las estrategias antígeno-específicas y no específicas mencionadas, tanto en forma independiente o en combinación. Aunque el desafío y la tarea por delante son formidables, la manipulación inteligente del sistema inmune jugará, sin duda, un rol importante en el control de las enfermedades parasitarias.

CO4. Cloning and characterization of genes for trypanothione metabolism in trypanosomatids.
SERGIO GUERRERO, FAOUZI MANAI, LEOPOLD FLOHÉ AND MAHAVIR SINGH.

GBF- German National Research Center for Biotechnology, and Technical University of Braunschweig, D-38124 Braunschweig, Germany

Most living cells contain high concentrations of spermidine, a polyamine, and glutathione, a tripeptide (Glu-Cys-Gly, GSH). GSH is the primary antioxidant molecule for scavenging reactive oxygen species. Parasitic trypanosomatids, e.g. *Trypanosoma cruzi* (Chagas disease), *T. brucei gambiense*/*T. brucei rhodesiense* (African sleeping sickness), *Leishmania* sp (Kala Azar) are responsible for severe diseases for which no effective drug with low side effects is available. Interestingly, these trypanosomatids are unique in possessing trypanothione (TSH) instead of GSH as the major

antioxidant molecule. Thus, the enzymes involved in which is not present the metabolism of TSH are attractive targets for rational drug design. Trypanothione is a bis(glutathionyl)spermidine conjugate, synthesized by two enzymes: 1. glutathionylspermidine synthetase (GSS or GSPs) and trypanothione synthetase (TS), both hydrolysing ATP with the formation of an amide bond. We have been interested in the GSS and TS as drug targets. These enzymes are expressed at very low levels in the parasites. *Crithidia fasciculata*, a parasite of domestic fly, also contains these enzymes. We recently reported a new method for the rapid purification of GSS from *C. fasciculata* (König et al., JBC, 272, 11908, 1997). Using this method, GSS was purified and characterized. In contrast to the GSS of *E. coli*, the GSS of *C. fasciculata* does not contain an additional amidase activity. Amino acid sequence of peptides from the purified GSS were obtained and based on the peptide sequences, oligonucleotides were synthesized. These oligonucleotides were used as probes for 1. isolating recombinant clones from a genomic bank of *C. fasciculata*, and 2. for PCR amplification using chromosomal DNA as a template. DNA sequence of the genomic clones and the PCR fragments were determined. Derived amino acid sequence of the GSS of *C. fasciculata* showed limited homology to the corresponding gene from *E. coli*. We are currently working on the expression and purification of recombinant GSS of *C. fasciculata* from *E. coli*. Isolation of the homologous genes from other trypanosomatids is in progress.

CO5. Perspectivas de control de la enfermedad de Chagas en América latina. Importancia del apoyo internacional. JOSÉ RODRIGUES COURA

Departamento de Medicina Tropical, Instituto Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), Av. Brasil, 4365 - Rio de Janeiro, Brasil.

La enfermedad de Chagas, que afecta entre 16 a 18 millones de personas y coloca en riesgo a más de 100 millones en las Américas, desde México hasta el sur de Argentina y Chile (WHO, 1991), es uno de los problemas más importantes de salud pública en el Continente Latinoamericano, representando, según el Banco Mundial (1993), la cuarta causa de incapacidad y de pérdida de años/vida sanos, entre las enfermedades infecciosas prevalentes en la región, superada apenas por las enfermedades respiratorias agudas, las diarreas infecciosas y el SIDA, se encuentra por encima de la tuberculosis, las helmintiasis, las enfermedades de la infancia, la malaria, la esquistosomiasis, la lepra y las leishmaniasis como "carga enfermedad" (Schmunis, 1994).

El control de la enfermedad de Chagas está basado en sus principales mecanismos de transmisión: por triatomíneos vectores y por transfusión de sangre. Existen más de 100 especies de triatomíneos vectores en la naturaleza, de los cuales más de 50 se han encontrado infectadas con *Tripanozoma cruzi*, pero sólo al-

gunas tienen importancia epidemiológica por haberse adaptado al domicilio humano. Los vectores más importantes son *Triatoma infestans* en Argentina, Bolivia, Brasil, Chile, Paraguay, Perú y Uruguay; *Panstrongylus megistus* y *T. brasiliensis* en Brasil; *T. sordida* en Argentina, Bolivia, Brasil y Paraguay; *Rhodnius palescens* en Panamá y *R. prolixus* en Colombia, México, Venezuela y América Central.

T. infestans coloniza en la mayoría de los países, excepto en Bolivia, exclusivamente el espacio domiciliario, tornándose vulnerable al rociado con insecticidas residuales (Coura, 1993) y a la mejora de las viviendas, al contrario de los vectores ubicuos. Los programas nacionales organizados de control de vectores se iniciaron en los años 60 en Argentina, en los años 70 en Brasil y en los años 80 en Chile y Uruguay, siendo fortalecidos en 1991 con la iniciativa de cooperación internacional de los Ministerios de Salud de los países del Cono Sur, coordinada por la Organización Panamericana de la Salud. Los gobiernos de Argentina, Brasil, Chile y Uruguay y más recientemente Paraguay, invirtieron desde 1992 hasta 1995, 207 millones de dólares en el control de la enfermedad de Chagas (Schmuñis, Zicker & Moncayo, 1996). En consecuencia hubo un gran progreso en el control. Por otro lado Bolivia, con una elevada prevalencia serológica de infección, está haciendo un gran esfuerzo para controlar al *T. infestans*.

Más de 3 millones de casas en aquellos países están bajo vigilancia entomológica y el impacto del programa de control de la enfermedad está siendo medido por el examen serológico de niños escolares. Argentina redujo en 75% la infestación de las casas por triatomíneos en 13 de 15 provincias endémicas entre 1982 y 1994, y en 1995 la tasa de infestación era de apenas 4%. En el mismo período la prevalencia serológica de infección chagásica entre jóvenes convocados para el servicio militar cayó de 5,8% a 1,2% y en 1995 llegó al 1%. En Brasil de 711 municipios infestados por *T. infestans* en 1982, apenas 83 estaban positivos en 1993, con una captura de sólo 2500 ejemplares (2,9% del total anterior), y ahora menos del 2% de las casas de 78 municipios todavía tienen un residuo de este triatomíneo.

La prevalencia serológica de infección chagásica en niños escolares en Brasil cayó de 4,5% en 1980 a 0,2% en 1995. En Chile la infestación domiciliar por *T. infestans* descendió de 29% en 1982 a 1,6% en 1995, y la prevalencia serológica en menores de 15 años cayó de 5,4% a 1,3% en 1995, la mayoría de ellas posiblemente debidas infección congénita. En Uruguay la infestación domiciliar descendió de 6% en 1983 a 0,35% en 1995 y la prevalencia serológica en menores de 12 años de 2,4% se acercó a cero en el mismo período (WHO, 1994-1997).

El problema ahora es el mantenimiento de los programas en los países del Cono Sur hasta la erradicación del *T. infestans* (esperada para el año 2000) y el incentivo para el desarrollo de programas semejantes en los países Andinos y de la América Central, donde los índices de infestación domiciliar por los triatomíneos, mencionados para cada país, todavía son muy eleva-

dos al igual que los índices de infección de la población. En Bolivia, por ejemplo, la media de prevalencia serológica para infección chagásica en la población rural está en el orden del 22% y en algunas localidades llega al 70% con un gran porcentaje de niños menores de 10 años infectados. Igual ocurre en Honduras y otros países de América Central.

A pesar de haber habido una reducción importante de transmisión de la infección chagásica en bancos de sangre, principalmente debido a la preocupación por la transmisión del HIV y de las hepatitis B y C, estimulando así, el control de la infección chagásica; sólo en Argentina, Brasil, Honduras, Uruguay y Venezuela, las pruebas serológicas son obligatorias en los bancos de sangre. En otros países esas pruebas son una decisión de los servicios de transfusión. En algunos, como por ejemplo Ecuador, ese servicio está a cargo de la Cruz Roja Internacional; otros, como Bolivia, pueden tener altas tasas de donadores infectados y ciertamente un elevado índice de transmisión por esa vía. La selección de donadores de sangre con por lo menos dos pruebas para infección chagásica debería ser obligatoria en todos los países. A pesar de ello se corre el riesgo de transmisión en algunos casos falso negativos.

El estímulo internacional para el control de la enfermedad de Chagas en América Latina es muy importante, como se ha verificado a través de la Organización Panamericana de la Salud en el caso del Cono Sur y de la Organización Mundial de la Salud, a través del TDR, que ha contribuido grandemente en el desarrollo de modelos para el control de vectores y de la transmisión de la infección chagásica en bancos de sangre, en prácticamente todos los países del continente. Lamentablemente, los fondos del TDR están siendo progresivamente reducidos principalmente para Pesquisas Estratégicas y Desarrollo de Productos, particularmente en relación a enfermedad de Chagas, concentrándose en países desarrollados no endémicos, exactamente lo opuesto de los objetivos originales del programa, equivocados a propósito con el pretexto de que la enfermedad de Chagas estaría controlada en los países endémicos subdesarrollados.

Es fundamental que los países de América Latina afectados por la enfermedad de Chagas, hagamos esfuerzos en conjunto con la Organización Mundial de la Salud y los organismos financiadores de TDR, a través de los Ministerios de Salud y de Relaciones Exteriores, a fin de que aquellos programas mantengan sus objetivos originales y aumenten los fondos para el apoyo de proyectos estratégicos de enseñanza, investigación y desarrollo de productos para el control de esta enfermedad que reduce francamente la capacidad de trabajo y los años de vida de nuestras poblaciones.

Referencias

- Coura JR. Cad. Saude Publica, Río de Janeiro, 9:514-518, 1993.
- Schmuñis GA. American trypanosomiasis as public health problem. In: Chagas' disease and the nervous system. PAHO Sci. Pub. 547:3-29, 1994.
- Schmuñis GA, Zicker F & Moncayo A. Lancet, 348 (90531: 1171, 1996.

- The World Bank. The global burden of the diseases. World development report 1993 investing in health. New York: Oxford University Press, 216-218, 1993.
- World Health Organization. Control of Chagas' disease. WHO Technical Report Series 811, 1991.
- World Health Organization. Weekly Epidemiol. Rec., 69 (U), 1994; 70 (3), 1995; 71(2), 1996; 72 (1/2), 1997.

CO6. Una vacuna contra *Trypanosoma cruzi*? ELSA L. SEGURA.

ANLIS "Dr. Carlos G. Malbrán". Av Velez Sarsfield 563 (1281) Buenos Aires, Argentina

Desde 1970 investigamos los componentes de *Trypanosoma cruzi*, con la finalidad de desarrollar una vacuna para la prevención de la infección por *T. cruzi* o para la prevención de la fase crónica de la enfermedad de Chagas. Ambos enfoques requieren de un mayor conocimiento de la respuesta inmune en la enfermedad humana. El prolongado período de incubación entre el comienzo de una infección y el desarrollo de la fase clínica de la enfermedad podría deberse a que la respuesta inmune a la primoinfección persiste con la salud y disminuye o se remodela con la enfermedad (Salk, J. *Nature*, 327,473-6, 1987). Si la respuesta inmune pudiera ser estimulada para crear resistencia contra *T. cruzi*, sería posible prevenir el desarrollo de la enfermedad. El conocimiento del genoma de *T. cruzi*, proveerá mayores posibilidades de identificar las moléculas apropiadas para ser inmunógenos candidatos. Nuestras contribuciones propusieron que la inmunización con la fracción flagelar del parásito, o algunos de sus componentes moleculares protegían al ratón, induciendo una inmunidad esterilizante en más del 40% de los animales desafiados con tripomastigotes infectantes.

La etapa siguiente requiere de una comprensión mayor del comportamiento de la infección en la naturaleza, a fin de utilizar en el diseño experimental el nivel del desafío parasitario, en relación a los marcadores definidos de inmunoprotección. Durante 1975-1985, nuestras investigaciones sobre el comportamiento de *Triatoma infestans* en el ambiente rural de la zona endémica de Argentina, demostraron que las zonas rurales presentaban una infestación domiciliar superior al 70 %, que la captura de *T. infestans* en el dormitorio humano, tenía un promedio de 20 insectos y que el 30% de los triatomíneos domiciliarios se hallaba infectado por *T. cruzi*. En dos viviendas demolidas despues de la revisación, se capturaron 2000 insectos, lo que significan 700 insectos portadores de *T. cruzi* en sus heces, dentro de la vivienda. Teniendo en cuenta la frecuencia alimentaria estimamos que 700 gotas de materia fecal de *T. infestans*, conteniendo *T. cruzi*, serían depositadas en la piel, próxima al orificio de la picadura o en mucosas, de los 5 habitantes de una vivienda, además de 6 perros, al menos cada 20 días.

Con esa carga parasitaria, a fines de 1980 y hasta mediados de esa década, no se estimó alentadora la utilización de una vacuna, debido a la continua reinfestación triatomínica de las viviendas. A pesar de esto, desde el punto de vista inmunológico, desarrollar

una respuesta inmunoprotectiva, estimulando específicamente con antígenos de *T. cruzi*, era una hipótesis razonable.

En los últimos 10 años se han registrado cambios drásticos en el panorama de la infestación domiciliar por *T. infestans*, en Argentina. Dichos cambios también han alcanzado a otros países del continente. Se trata de la disminución en algunas zonas y hasta la inexistencia de poblaciones de *T. infestans* en la vivienda humana. Por otra parte, se ha registrado la disminución de casos agudos, en los Centros médicos en la zona endémica en los que habitualmente se notificaban los casos.

Nuestra hipótesis es que la oportunidad de utilizar una vacuna contra la transmisión de *T. cruzi*, se presentaría cuando mejoraran las condiciones de control de poblaciones de triatomíneos y se podría hacer realidad, acompañando la vigilancia entomológica de la transmisión de *T. cruzi*.

CO7. Control de la transmisión de la enfermedad de Chagas en Brasil. JOÃO CARLOS PINTO DIAS.

Facultad de Medicina de la Universidad Federal de Minas Gerais, Fundación Oswaldo Cruz y Fundación Nacional de Salud en Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brasil. Fax: 55 31 261 6793, E-mail: fnsicrmg@net.em.com.br

Antecedentes: la enfermedad de Chagas (EC) fué descubierta en 1909 por Carlos Chagas, en Brasil, constando una precoz advertencia política y sanitaria de ese genial investigador, ya en 1911, de que se trataba de un tema altamente prioritario por su magnitud y morbi-mortalidad, un verdadero problema del Estado, que debería ser mirado con vistas a su control, en nombre de la dignidad de los pueblos afectados: entre *nós a iniciativa de medidas sanitárias justifica-se, sem dúvida, em considerações mais elevadas: é o futuro de um grande povo que se deverá zelar; são deveres de humanidade e de patriotismo que devem actuar no espírito progressista dos homens de estado; é a vida humana, é progresso material, o aperfeiçoamento de uma raça que degenera, o obstáculo ao trabalho productivo, é a grandeza economica de vastas zonas do país..., tudo indicando a urgencia de medidas sanitarias capazes de attenuar a acção maléfica do Conorrinhos megistus*" (Chagas, 1911). Las investigaciones básicas para el control de la transmisión de la EC fueron llevadas al cabo por E. Dias en Minas Gerais, desde 1943, con resultados altamente promisorios tanto a través de los mejoramientos de vivienda como por el uso de insecticidas de acción residual; Dias consideraba que los elementos básicos al control de la EC ya estaban disponibles en los años 50 y eran dependientes de deseo político, de acciones con calidad, continuidad y en zonas contiguas, pronosticando entonces el total control de la transmisión vectorial y la erradicación del *Triatoma infestans* en todo el País (Dias, 1958). El programa nacional contra la EC en Brasil fué iniciado a partir de 1959, con prioridad efectiva solamente en 1982 (cobertura total del área endémica), basado fundamentalmente en el control químico de los vectores

domésticos, por el Ministerio de Salud; el mejoramiento de las viviendas no pertenecería a ese Ministerio y nunca ha arrancado, en términos nacionales. El Estado de São Paulo tuvo iniciativa propia contra la EC, en los años 60, con cobertura de toda esa provincia con acciones continuadas con insecticidas, resultando interrupción virtual de la transmisión ya en la década siguiente (Días, 1997). Para la priorización del programa nacional fué fundamental la participación de la comunidad científica, no solamente desarrollando los métodos e insumos, como haciendo verdadera presión política. Con datos entomológicos, de prevalencia y de morbi-mortalidad; demostrabase que la EC estaba dispersa en 2.500 municipalidades del País y afectaba cerca de 5 millones de individuos, entre los cuales unos 30% ya tenían o iban desarrollar una cardiomiopatía chagásica. También se demostraba que la transmisión transfusional del *T. cruzi* era marcante en el país, llegando, en 1979, a una incidencia de 20.000 casos anuales (Días, 1988).

Programa contra la EC en Brasil: estrategias y resultados. El esquema básico fue lo de Emmanuel Días, a través de la lucha química contra los vectores, al nivel domiciliar y peridomiciliar, con vistas a la interrupción de la transmisión vectorial, por el Ministerio de la Salud (SUCAM/FNS), con presupuestos federales. No se contemplaron acciones al nivel del ciclo silvestre del parásito, ni contra los reservorios naturales. La lucha contra la EC transfusional fué desarrollada al nivel de todo el sistema de salud, con elección de la estrategia de descarte de donantes chagásicos a través de serología pre transfusional. La lucha antivectorial fué continua y conducida conforme el modelo clásico de las campañas antipalúdicas (fases de preparación, ataque, consolidación y vigilancia), garantizada por un presupuesto estable (entre 15 y 25 millones US\$/año) y por normas técnicas bien definidas, con acompañamiento y supervisión técnica y epidemiológica. El insecticida de elección fué el Gammexane (HCH al 30% isómero γ) en la concentración de 500 mg/m², para rociados semestrales en el ataque. En seguida dábanse las "evaluaciones", con investigación entomológica de las unidades domiciliarias y rociado inmediato de las encontradas positivas. La vigilancia fué instalada en condiciones de baja infestación (Índices de infestación por abajo de los 5%), y con una característica de acciones horizontales, con agentes de salud municipalizados y detección de los focos por la propia población (participación comunitaria). El Programa fué muy activo entre 1982 y 1989, realizando cerca de 4 a 5 millones de visitas domiciliarias y entre 500.000 y 1,2 millones de rociados por año. En los años 90, trabajando ya con infestación mas baja, el Programa también sufrió dificultades con su recurso humano, parcialmente cedido a la lucha contra el *Aedes aegypti*: en el inicio contaba con cerca de 6.000 agentes en el Programa, llegando a poco más de 2.000 en los años 90 (Silveira & Rezende, 1994). En 1985, con dificultades de adquisición y políticas ambientales contrarias a los productos organo-clorados, el Programa empezó a utilizarse de los Piretroides (grupo α -ciano substitución), con buenos resultados. Actualmente se utilizan principalmente, por m², la Deltametrina (25 mg), las

Cipermetrinas (125 mg), la Ciflutrina (50 mg) y la λ -Cialotrina (30 mg), con preferencia para las formulaciones de polvo-mojable y "flowables" (Días, 1997). A partir de la última mitad de los 80, progresivamente avanzaron las acciones de vigilancia, desde que muchos municipios ya entonces presentaban tasas de infestación domiciliar por abajo de los 5% y también porque el *T. infestans*, principal transmisor en el país, rápidamente estaba desapareciendo de las regiones rociadas; por otro lado, las especies nativas mas importantes (*T. brasiliensis*, *T. pseudomaculata*, *T. sordida*, *Panstrongylus megistus* y *Rhodnius neglectus*), aunque bajaban sus tasas de infestación donde el Programa se instalaba, nunca lograban desaparecer (erradicación) como el *T. infestans*, pero también presentando disminución de densidad frente los insecticidas. En paralelo, las encuestas sero-epidemiológicas en los municipios trabajados, entre niños de escuelas, empezaron a demostrar una sensible reducción en las tasas de infección, como resultado del descenso de la densidad triatomo-tripanosómica. Por ejemplo, en regiones previamente críticas de los Estados de S. Paulo y Minas, como Cassia dos Coqueiros y Bambuí, donde las tasas de prevalencia de la EC entre escolares de 7 a 14 años eran de cerca de 40 % en los años 50, ya en 1970 llegaban a menos del 5% y en los años 90 se mantuvieron cerca de 0% (Días, 1997). Así mismo, como producto del control vectorial, las tasas de EC entre donantes de sangre y mujeres embarazadas, en las regiones endémicas, han logrado enorme descenso, encontrándose hoy día en promedios respectivamente de 0,7% y 0,5%, lo que demuestra también una notable reducción en el riesgo de transmisión de la EC por vías transfusional o congénita (Días, 1997). Por otro lado, también se nota una significativa reducción de los Índices de morbi-mortalidad entre poblaciones infectadas de todo el País, hechos todavía aún sin completa explicación. Al nivel del *T. infestans*, la especie encuéntrase erradicada en más del 90% de los 811 municipalidades infestadas en los años 70, quedando una infestación residual focalizada en pocos municipios de los Estados de Bahía, Goiás y Río Grande do Sul, así mismo con muy baja densidad triatominica y tripanosómica (Días, 1997, Silveira y Rezende, 1994). En ese contexto, además del Programa, seguramente también han influido otros factores como la gran migración rural-urbana y un mejoramiento espontáneo de las viviendas rurales quedantes. A su vez, el control de los bancos de sangre ha crecido mucho a partir de los años 80, especialmente con el arribo de la SIDA, hoy día pudiendo estimarse que cerca del 85% o más de los servicios de hemoterapia hacen screening serológico pre-transfusional en el país (seguramente, arriba del 98% para el Estado de São Paulo). No hay, todavía, un programa de control del Chagas congénito, aunque se sepa que esa modalidad de transmisión es cada vez más rara en el País. En términos de impacto, el Programa Brasileño contra la EC ha sido exitoso y con alta tasa de retorno económico y social (Schofield & Días, 1991). En un estudio reciente, se ha considerado que, entre 1993 y 1996, ese Programa ha costado cerca de 400 millones de US\$, a su vez ahorrando por lo menos US\$900 millones solamente en el

ámbito de la sobrevida; en ese periodo, pueden acreditarse al Programa la prevención de por lo menos 277.000 casos nuevos y 85.000 muertes por la EC (Akhavan, 1997).

Perspectivas, horizontes y desafíos. Las perspectivas serán muy buenas desde que se mantengan las actividades con un mínimo de cobertura y calidad, especialmente en términos de la lucha antivectorial y del control de los bancos de sangre. La tendencia actual es de marcado descenso en las tasas de transmisión vectorial de la EC en todo el País, con eso bajándose netamente las perspectivas también de las transmisiones por ruta transfusional o congénita (por falta de donantes y embarazadas infectados). En términos de presupuesto no parecen existir muchos problemas, desde que históricamente han sido sensibilizados los ministros y políticos; sin embargo, el problema de los recursos humanos se viene agravando, por una tendencia de búsqueda de un "Estado Mínimo", donde no se permiten contrataciones y siquiera reposición de cargos jubilados. La salida está en conseguir aporte de personal en los propios municipios, a través de mecanismos de repase de presupuestos federales (por convenio o vía fondo-a-fondo). Así mismo, el actual panorama epidemiológico destaca, al nivel entomológico, las especies "secundarias" y el ámbito peridomiciliar, como los principales horizontes de trabajo. Ahí se complican las acciones clásicas contra los triatominos, ya que sus reservas naturales (selváticas), diferentemente del *T. infestans*, existen y pueden ser prácticamente inagotables; también funcionan mucho menos bien los insecticidas disponibles, así como los métodos tradicionales de investigación y captura de triatominos. Con todo eso, crecen en importancia las acciones y estrategias horizontales de vigilancia epidemiológica con participación comunitaria. Actualmente, cerca de 90% de los 2.500 municipios brasileños previamente infestados se encuentran con una infestación triatomínica domiciliar por abajo de los 2%, con eso también prevaleciendo el horizonte de la vigilancia continuada. Las acciones comunitarias pueden y deben involucrar el manejo de la casa y del peridomicilio, además de detectar triatominos y ayudar en la búsqueda de casos agudos de la EC. El trabajo con poblaciones no es fácil y contraria la rutina histórica del Programa tradicional, hecho que presupone muchos cambios institucionales y de mentalidad (Días, 1991). Por otro lado, nuevas áreas de colonización triatomínica en viviendas humanas pueden surgir (y ya están surgiendo) en la Región Amazónica, como resultado de las migraciones humanas y del desequilibrio ecológico producido en la región. Tratase generalmente de la invasión doméstica por triatominos silváticas con altas tasas de infección natural por *T. cruzi* (principalmente del género *Rhodnius*), situación esa que exige esquemas de prevención muy distinto de las rutinas habituales. Al nivel de la EC transfusional, los desafíos son el aumento de la cobertura de acciones de control serológico de la sangre y la derivación adecuada de eventuales donantes infectados al sistema de salud. Un programa mínimo de serología precoz en niños de 6 meses está en curso experimental en Minas Gerais, como estrategia para detección y tratamiento de la EC congénita. Queda como último

desafío el monto de 4 millones de infectados, en su mayoría adultos arriba de los 30 años de edad y en la forma crónica indeterminada de la EC, a merecer atención médica adecuada y también de seguridad social: aquí se destacan las perspectivas de beneficio que hoy se plantean al nivel del tratamiento específico de individuos de baja edad o aquellos en la forma indeterminada de la EC, lo que merece mejor investigación.

Necesidades de investigación. Frente al panorama presente, el control de la EC en Brasil podría ser mejorado con el desarrollo de insumos y estrategias de control mas efectivo de los triatominos en el peri-domicilio, especialmente en términos de insecticidas más eficientes y mejores herramientas de detección de focos en situación de baja densidad triatomínica. Mejoramiento de la serología para detección precoz de la EC congénita y de la transfusional son otros requerimientos en términos de sensibilidad, de especificidad, de bajo costo, de simplicidad y de rapidez. Siguen las necesidades de mejor fármaco para el tratamiento específico, así como también una vacuna efectiva aún tendría importancia en áreas de transmisión residual. El mejor manejo de pacientes crónicos sigue aún como necesario, especialmente en términos de prevención de la cardiomiopatía chagásica crónica más grave (Días, 1991, 1997).

Referencias:

- Akhavan D, 1997. Análise de custo-efetividade do programa de controle da doença de Chagas no Brasil. Monografia. Brasília, Ministerio da Saúde, 44 p.
- Chagas CRJ, 1911. Molestia de Carlos Chagas (II Conferencia na Academia Nacional de Medicina). In Carlos Chagas, coletânea de trabalhos científicos. Aluisio Prata (organ.), Brasília, Editora Universidade de Brasília, p. 167-192, 1981.
- Dias E, 1958. Profilaxia da doença de Chagas. O Hospital, 51: 285-298.
- Dias JCP, 1988. Reseña histórica de los conocimientos sobre la enfermedad de Chagas y reflexiones sobre algunos aspectos políticos y socio-económicos de la endemia en el contexto latinoamericano. Rev. Feder. Argent. Cardiol. 17: 121-135.
- Dias JCP, 1997. Controle da doença de Chagas. In Clínica e Terapêutica da Doença de Chagas. Dias JCP & Coura JR (orgs), Rio de Janeiro. Editora Fiocruz, p. 453-468.
- Schofield CJ & Dias JCP, 1991. A cost-benefit analysis of Chagas disease control. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 86: 2885-295.
- Silveira AC & Rezende DF, 1994. Epidemiologia e controle da transmissão vetorial da doença de Chagas no Brasil. Rev. Soc. Bras. Med. Trop. 27 (supl. III): 11-22.

CO8. Futuro de la atención del infectado chagásico ALUIZIO PRATA.

Faculdade de Medicina do Triângulo Mineiro. Uberaba, Minas Gerais, Brasil.

Con el control de la transmisión de la enfermedad de Chagas por triatominos y el mejor control de la calidad de sangre para transfusión, se torna cada vez más

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 reducidos 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, ultracriomicrotomía 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 reservorios (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 parasitofora 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-ÍÑÓN.

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 *trck1* y *trck2*, correspondientes a quinasas relacionadas a *cdc2*, CRK, que presentan un alto porcentaje de identidad con genes clonados en otros tripanosomátidos. *trck1* 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*. *trck2* codifica para una proteína de 33 kDa, que posee 52,7% de identidad con

cdc2 humana y >78% de identidad con CRK1 de *T. brucei*, *Leishmania mexicana* CRK1 y *T. congolense* CRK1. Por análisis de Southern blot se reveló que *tkr2* está codificada por un gen de copia única mientras *tkr2* es multigénica. La proteína TCRK2 recombinante es capaz de fosforilar *in vitro* histona H1 y Rb, la proteína del gen de retinoblastoma. Análisis de Western blot con un antisuero policlonal específico para TCRK2 demostró que la quinasa está presente en todas las formas amastigote, tripomastigote y epimastigote del parásito. El antisuero que reconoce el dominio PSTAIRE de la cdc2, revela proteínas de 32, 33, y 35 kDa, que se expresan diferencialmente durante el ciclo de vida *T. cruzi*. Se demostró que *tkr2* transfectada en células COS-7 es capaz de co-immunoprecipitar con ciclinas D3, E y A. Esto demuestra por primera vez que una CRK es capaz de interactuar con ciclinas de células de mamíferos, y sugiere que estas quinasas están involucradas en el control del ciclo celular. También indican que el parásito debería poseer ciclinas homólogas para controlar la actividad de CRKs regulando el ciclo y la diferenciación del mismo.

Tratamiento de chagas en fase indeterminada

MR4. Treatment of *Trypanosoma cruzi* infected children in Brazil. ANA LUCIA S. SGAMBATTI DE ANDRADE.

Departamento de Medicina Tropical. Saúde Coletiva e Dermatología. Instituto de Patología Tropical e Saúde Pública. Universidad federal de Goiás

Specific chemotherapy for Chagas' disease (ChD) has been successfully used in clinical practice for treating acute and congenital disease but with low impact in the endemicity since the majority of patients comprises of indeterminate and chronic stages of Chagas' disease. Few clinical trials have been conducted in the indeterminate phase and the effect of treatment has not produced convincing results. BZ is the only commercially available drug currently used in the treatment of ChD in Brazil. We have conducted a phase III randomized double blind trial in an endemic area in central Brazil to assess the safety and efficacy of Benznidazole in the treatment of children with *T. cruzi* early infection.

A serological screening was conducted among 1,990 schoolchildren, 7 - 12 years old to select the participants. A total of 129 schoolchildren, (7-12 years old) with 4 positive serological test to *T. cruzi* (IIF, IHA, ELISA and Chemiluminescent-ELISA) were enrolled to receive either Benznidazole / BZ (n=64), or placebo/ PL (n=65), both given at a dose of 7.5 mg per kg bodyweight divided in two daily doses during 60 days. The randomization procedure was done in blocks of 6 children, after sex and age stratification. Serum samples were taken at the last day of treatment (day 60), and 3, 6, 12 and 36 month after completing the treatment.

The primary end-point established for the trial was the negative seroconversion of specific antibodies at the

end of a 3-year follow-up period and the final analysis was done according to the intention-to-treat principle, including all subjects who have received at least one week of treatment. The secondary end-point was a 3-fold or greater reduction of antibody titres evaluated through repeated serological tests.

The trial results showed that BZ was well-tolerated, light adverse effects such as nausea, anorexia, headache, stomach ache and arthralgia were reported by less than 5 % of subjects. Cutaneous maculo papular rash and pruritus during the treatment were more frequent in the BZ group (8 cases) than in the placebo group (2 cases), $p < 0.05$, this was the reason for withdrawing one patient from the study (BZ group).

The treatment compliance and follow-up was successful (87 %) with a few lost to follow-up. The intention-to-treat analysis based on results of CL-ELISA indicated 57.8 % of treatment success (37/64) in the BZ group versus 4.6 % (3/65) in the PL group ($p < 0.001$). The 21 subjects in the BZ group who did not turn out negative presented statistically reduced antibody level as compared to their initial measurements suggesting a tendency towards the negativity. At the end of the follow-up, children who received BZ treatment had IIF GMT reduced 5-fold as compared to placebo, 195.8 (95 % CI 147-256) and 1068.2 (95 % CI 809-1408), respectively ($p < 0.01$). The trial demonstrated that a 60-day course of Benznidazole treatment was 55.8 % (95 % CI 40.8-67.0) efficacious in producing negative seroconversion of specific antibodies, which was used as a surrogate measure of parasite clearance.

The BZ efficacy by this study justify to recommend treatment for seropositive children as public health policy, besides its confirmed safety. The evaluation of the impact of the trypanocidal treatment in preventing the progression of infection to disease morbidity and its complication still remain to be established.

MR5. Evolución de la miocardiopatía chagásica crónica con y sin tratamiento etiológico RODOLFO VIOTTI, CARLOS VIGLIANO, BRUNO LOCOCO, ALEJANDRO ARMENTI.

Sección Chagas, Servicio de cardiología, Hospital Eva Perón, San Martín, Buenos Aires, Argentina.

A partir de 1936 en que Salvador Maza trató el primer caso de Chagas agudo, se comenzó la investigación de drogas parasiticidas con aplicación clínica, culminando en 1965 con Nifurtimox y en 1973 con Benznidazol. La falta de evidencias de la efectividad en la etapa crónica y los efectos adversos que estas drogas generan, desacreditan el tratamiento etiológico, a pesar de los trabajos experimentales que demuestran lo contrario. Faltó tiempo de seguimiento como toda enfermedad de evolución crónica y no se evaluaron criterios clínicos de progresión de cardiopatía. Se muestra el seguimiento de 304 pacientes durante 10 años, tratados (pt) con Benznidazol 5mg/kg-día-30días y no tratados (pnt) y su evolución clínica, electrocardiográfica y serológica.

Resultados: Cambios electrocardiográficos según rango etareo: pacientes entre 30-39 años: 0/59 pt vs

4/38 pnt tuvieron cambios ($p < 0,05$); entre 40-49 años: 6/83 pt vs 15/53 pnt ($p < 0,001$); en mayores de 50 años no hubo diferencias significativas. La evolución electrocardiográfica a 10 años para todo el grupo fue del 20% para los pnt y del 4,2% para los pt.

Cambios en su condición clínica de ingreso: los pt mostraron mejor evolución clínica que los pnt, especialmente los que tenían cardiopatía leve al ingreso: 2/39 pt empeoraron su cuadro clínico a 10 años vs 9/32 pnt ($p < 0,01$).

Evolución serológica: 21/110 pt negativizaron las 3 reacciones vs 3/50 pnt ($p < 0,05$), en ambos grupos no hubo cambios electrocardiográficos. 49/110 pt vs 33/50 pnt persistieron con títulos elevados, a pesar de ello el grupo de pt mostró menos cambios electrocardiográficos ($p < 0,02$). Con 1 ó 2 reacciones negativas no hubo diferencias significativas.

Mortalidad: Sobre un total de 233 pacientes, 14 fallecieron a lo largo del seguimiento: 3/142 pt vs 11/91 pnt ($p < 0,01$).

Variables predictoras: El tratamiento con Benznidazol fue una variable independiente que se correlacionó en forma negativa a los cambios del electrocardiograma. Con respecto a su evolución clínica, los pacientes con deterioro moderado de su función cardíaca al ingreso y librados a su evolución natural mostraron agravamiento de su cardiopatía (correlación positiva); no así los que recibieron tratamiento etimológico (correlación negativa). Sólo el tratamiento con Benznidazol se relacionó a la seronegatividad de 2 y 3 pruebas serológicas (correlación positiva).

Conclusiones: Solamente la presencia del parásito como causante de la progresión de la miocarditis en la etapa crónica, puede explicar los resultados obtenidos con el tratamiento etimológico. La introducción de la evolución clínica de los pacientes con cardiopatía Chagásica crónica es de fundamental importancia, porque todos nuestros esfuerzos tienden a mejorar la cantidad y calidad de vida de estas personas.

MR6. Eficacia de la quimioterapia con benznidazol en niños infectados por *Trypanosoma cruzi*, en fase indeterminada de la enfermedad de Chagas. S. SOSA ESTANI, E.L. SEGURA, E. VELAZQUEZ, A.M. RUIZ, B.M. PORCEL, C. YAMPOTIS, P. ALBORNOZ, L. MEDINA, M. YELAMO.

CEDIE/ANLIS «Dr. Carlos G. Malbrán», INP «Dr. Mario Fatała Chaben», Ministerio de Salud de Salta.

La enfermedad de Chagas, puede cursar con una fase aguda, hasta los 6 meses de adquirida la infección, una fase indeterminada sin sintomatología y una crónica en la cual aproximadamente el 30% de los infectados presentan alguna evidencia clínica luego de aproximadamente 15 años. Hasta el presente el tratamiento con nifurtimox o benznidazol son indicados en la fase aguda y en los niños infectados hasta los 3 años de edad. El objetivo de este trabajo fue evaluar la eficacia y tolerancia del tratamiento específico, en niños entre

6 y 12 años de edad, con infección por *T. cruzi* en fase indeterminada tratados con benznidazol. Se diseñó un ensayo clínico, aleatorio a doble ciego para evaluar la eficacia y tolerancia del tratamiento con benznidazol a una dosis de 5 mg/kg/día durante 60 días, o placebo y evaluados con un seguimiento durante 48 meses. El área de estudio comprende 14 localidades ubicadas en el noroeste de Argentina, al norte de la Provincia de Salta. El 70% de los niños vivían en el área rural. Esta área se encuentra bajo vigilancia entomológica desde 1982. Los niños fueron pareados por edad en cada localidad para recibir benznidazol (NTb) or placebo (NTP). El tratamiento fue ambulatorio y los comprimidos fueron administrados por padres, maestros, o enfermeros de puestos sanitarios. Se realizaron controles médicos continuos con estudios de laboratorio clínico (hemograma completo, hepatograma, creatinina, orina completa) y electrocardiograma (ECG) para evaluar la tolerancia a través de la aparición de efectos adversos. Se consideraron severos si estos estaban presentes y obligaban a la suspensión, internación y tratamientos especiales, moderados si estos estaban presentes y llevaban a la interrupción sin internación, y leves si estos estaban presentes pero permitieron completar el tratamiento. Para evaluar la efectividad se realizaron estudios serológicos antes de tratamiento (línea de base), y a los 3; 6; 12; 18; 24 y 48 meses después del tratamiento. Estos incluían Ensayo inmunoenzimático (ELISA), hemo-aglutinación indirecta (HAI) e inmunofluorescencia indirecta (IFI). Se implementó una nueva ELISA (ELISA F29) usando una molécula recombinante definida como antígeno F29, obtenida de proteína flagelar de *T. cruzi*. Al final del seguimiento se realizó xenodiagnóstico. Ciento seis niños completaron el tratamiento bajo protocolo, 55 NTb y 51 NTP. Hubo una buena tolerancia al tratamiento. En menos del 30% se registró algún efecto adverso que incluyeron cólico intestinal, exantema morbiliforme, cefalea, anorexia, vómito, náuseas, diarrea, mareo, parestesia o temblor. Durante el tratamiento solamente cólico intestinal y exantema morbiliforme fueron mas frecuentes en los NTb que en los NTP ($p < 0,05$), con una media de días de aparición de 11.3 \pm 9.6 y 19.5 \pm 16.7 respectivamente. Ningún niño presentó efectos adversos severos y 10%(6/55) tuvieron efectos adversos moderados. Todos los efectos adversos observados desaparecieron al disminuir la dosis o interrumpir el tratamiento. Usando serología convencional, en los NTb se observó un decrecimiento significativo de las medias del log₂ de los títulos en la HAI y la IFI; y la densidad óptica en la ELISA, mientras no se observaron cambios significativos en los NTP. Después de 48 meses se observó seroconversión (seropositivo a seronegativo) en 11.3%(5/44) de los NTb y en 4.5% de los PTP (Test de Mc Nemar, $p < 0,05$). El porcentaje de niños seronegativos por ELISA F29, aumentó de 35.7% a 62.1%, 6 y 48 meses después del tratamiento respectivamente. Al final del seguimiento 38% de los NTb y 100% de los NTP permanecieron seropositivos usando ELISA F29 ($p < 0,001$). Los xenodiagnósticos realizados al final del seguimiento fueron positivos en 51.2% de los PTP y en 4.7% de los NTb ($p < 0,001$). Nuestro trabajo

demostró que el tratamiento en el esquema propuesto: Es efectivo en más del 60% de los casos tratados. Es bien tolerado, y posible de ser implementado ambulatoriamente en niños residentes en área rurales. Aunque siempre los pacientes deben residir en viviendas bajo vigilancia entomológica y tener acceso al sistema de salud local para la supervisión médica. Es posible evaluar la efectividad con un marcador precoz, usando una molécula recombinante definida (F29), implementada a través de un rápido y simple procedimiento serológico (ELISA). Ofrece una buena oportunidad de tratar y obtener cura en las primeras décadas de la vida, reduciendo el riesgo del desarrollo de las lesiones viscerales de la fase crónica.

Funcionalidad de moléculas caracterizadas de protozoarios

MR7. Putative host cell receptors for tc-85 glycoproteins from *Trypanosoma cruzi*. MARIA JULIA MANSO ALVES.

Departamento de Bioquímica- Instituto de Química- USP, 05508-900, S. P.E-mail: mjalves@quim.iq.usp.br

T. cruzi has to invade cells in order to survive in the mammalian host. As expected, much attention has been given to the identification of receptors and counter receptors involved in the interaction between both cells. Our laboratory described a monoclonal antibody (H1A10 MAb) able to inhibit the invasion of tissue-culture cells by *T. cruzi* (Alves *et al.*, Mol. Biochem. Parasitol. 21, 75, 1986). H1A10 MAb recognizes a polymorphic 85 kDa surface glycoprotein from *T. cruzi* previously described as Tc-85 (Katzin & Colli, Biochim. Biophys. Acta 68, 208, 1983), suggesting its involvement in the invasion process. Tc-85 has a half-life of 3.5-4 h and is synthesized as a 95 kDa precursor (Abuin *et al.*, Braz. J. Med. Biol. Res. 29, 335, 1996). Heterogeneity in molecular mass, isoelectric point and carbohydrate composition were identified (Abuin *et al.*, Mol. Biochem. Parasitol. 35, 229, 1989; Couto *et al.*, Mol. Biochem. Parasitol. 26, 145, 1987; Couto *et al.*, Mol. Biochem. Parasitol. 39, 101, 1990). Tc-85 has a glycosylphosphatidylinositol (GPI) anchor (Couto *et al.*, Eur. J. Biochem. 217, 597, 1993) and is shed into the medium within membrane vesicles, bearing an acyl-inositol modified anchor (Abuin *et al.*, Exp. Parasitol. 80, 605, 1996). The shedding mechanism is still unknown.

Cloning and characterization of a full length genomic DNA allowed us to include Tc-85 into the Sialidase/Trans-sialidase supergene family, with other members without enzymatic activity. Also, the epitope recognized by H1A10 MAb could be identified by competition assay with synthetic peptides. Sequencing of different clones showed heterogeneity among them, including the encoding region of the epitope recognized by H1A10 MAb. The data led us to propose that all members belong to a gene family, the so called Tc-85 gene family.

Tc-85 glycoproteins show a large pI range but only the acid portion binds in a carbohydrate-independent way to laminin, an important component of basal membrane (Giordano *et al.*, Mol. Biochem. Parasitol. 65, 85, 1994). Anti-idiotypic antibodies (Id) raised against the Tc-85 monoclonal antibody recognize three polypeptides in the host cell (150-130, 73 and 43 kDa). Also the anti-Id antibodies do not react with laminin, suggesting that Tc-85 interacts with different host receptors. Anti-Id antibodies react with tissue culture cells, as well as with molecules present in liver, heart, muscles or spleen, an interesting observation, since *T. cruzi* invades different tissues in the mammalian host. The cloning of putative host cell receptors is being pursued to further characterize host-parasite interactions. Supported by: FAPESP, PADCT/CNPq

MR8. Estructura, antigenicidad y posibles funciones de la cruzipaina, la cisteína proteinasa principal de *Trypanosoma cruzi*. J.J. CAZZULO, V. DUSCHAK, F. PARUSSINI, C. LABRIOLA Y J. MARTÍNEZ.

Instituto de Investigaciones Biotecnológicas, Universidad Nacional de General San Martín. C.C. 30, 1650 San Martín, Buenos Aires, Argentina. jcazzulo@inti.edu.ar

La cruzipaina es la cisteína proteinasa (CP) principal presente en el *Trypanosoma cruzi* (1). Su expresión está regulada durante el desarrollo y diferenciación, siendo los niveles en epimastigotes entre uno y dos órdenes de magnitud más altos comparados con las otras formas del parásito. La enzima está codificada por un número elevado de genes dispuestos en tandem (hasta 130 en la cepa Tul 2), localizados en dos a cuatro cromosomas, en diferentes stocks del parásito. La cruzipaina madura (una vez procesados el péptido señal y el dominio pro-) consiste de una parte catalítica, estructurada en dos dominios que dejan entre ellos el surco del sitio activo, y que presenta alta homología con otras CPs pertenecientes a la familia de la papaina, como las catépsinas S y L, y un dominio C-terminal (C-T), homólogo con el de las CPs de Tipo I (según la clasificación de Coombs y Mottram) presentes en varios otros Trypanosomatidos. El C-T, que puede ser purificado después de auto-proteólisis, contiene modificaciones post-traduccionales (N-glicosilación, pudiendo presentarse cadenas de alta manosa, híbridas monoanténarias o complejas bianténarias en el mismo residuo de Asn; probablemente cuatro puentes disulfuro; y modificaciones aún no identificadas en siete residuos de Thr, las cuales no parecen ser fosforilaciones ni O-glicosilaciones. Evidencias muy recientes sugieren la posible presencia de O-glicosilación, probablemente en otros residuos de Ser/Thr). El clonado y secuenciación de 34 cDNAs obtenidos de epimastigotes de Tul 2, así como de 14 cDNAs obtenidos a partir de las cuatro formas del parásito (cepa RA) indica la expresión simultánea de diferentes genes con polimorfismos en el C-T, que se traducen en cambios de residuos de aminoácidos que alteran el pI de la

molécula. Probablemente ambos factores, expresión simultánea de diferentes genes y variación en las modificaciones post-traduccionales, son responsables de las heterogeneidades en carga y tamaño aparente encontradas en preparaciones enzimáticas naturales. A esto debe sumarse la presencia de isoformas ligadas a la membrana plasmática, presumiblemente a través de un ancla de glicosil fosfatidil inositol (GPI), y de isoformas no glicosiladas o con un patrón de glicosilación muy diferente, pues no interaccionan con Concanavalina A.

El C-T es responsable de la inmunoreactividad de la cruzipaina, que es un antígeno inmunodominante en la enfermedad de Chagas crónica. La inmunización de conejos con la enzima nativa conduce a la producción de anticuerpos dirigidos casi exclusivamente contra el C-T, en tanto que la inmunización con cruzipaina desnaturalizada induce, además, la producción de anticuerpos contra la parte catalítica.

Entre las funciones posibles de la cruzipaina podemos mencionar: (1) digestión proteica intralisosomal, encontrándose presente en los reservorios; (2) penetración del parásito en la célula huésped, en la que podrían estar involucradas las isoformas de membrana; (3) defensa del parásito contra el sistema inmune del huésped, a través de un proceso de «fabulación»; (4) participación en las etapas de diferenciación en el ciclo biológico del parásito, que pueden ser bloqueadas por inhibidores irreversibles específicos para CPs, los cuales son capaces de inhibir a la cruzipaina dentro de los parásitos vivos. Financiado por SAREC (Suecia), el TDR/WHO y la Universidad de Buenos Aires.

(1) Cazzulo, J. J., Stoka, V. & Turk, V. Cruzipain, the major cysteine proteinase from the Protozoan parasite *Trypanosoma cruzi*. *Biol. Chem.* 378 (1997) 1 - 10.

MR9. Anclaje de glicoproteínas por glicoinositolfosfolípidos y diferenciación en *Trypanosoma cruzi*. ROSA M. DE LEDERKREMER.

CIHIDECAR. Departamento de Química Orgánica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, UBA.

El anclaje de proteínas a membrana por un glicoinositolfosfolípido (GPI) es particularmente frecuente en protozoarios parásitos. En *T. cruzi*, se identificó este tipo de anclaje en glicoproteínas caracterizadas en distintos estadios del parásito; algunas de ellas involucradas en el proceso de infección. Es interesante que mientras en glicoproteínas de mamíferos y también en *Trypanosoma brucei* se describió un glicerolípido como componente del ancla, en algunas glicoproteínas importantes de *T. cruzi*, se identificó una ceramida. Ssp4 es una glicoproteína marcadora de la diferenciación de tripomastigotes a amastigotes. Se ha demostrado por criterios inmunológicos y morfológicos que este proceso puede ocurrir *in vitro* (Andrews *et al* 1987, Exp. Parasitol. 64, 474-484). Ssp4 se libera progresivamente al medio por acción de una fosfolipasa C endógena específica para fosfatidilinositol (PI-PLC) durante la diferenciación de amastigote a epimastigote (Andrews *et*

al, 1988, J. Exp. Med. 167, 300-314). Recientemente determinamos los lípidos libres que se biosintetizan en parásitos obtenidos después de 0, 24, 48 y 72 h de diferenciación de tripomastigotes seguida de incorporación de [³H]-palmitico por 2 h. Encontramos un máximo de ceramida libre a las 24 h, coincidente con el máximo de formas amastigote. Sólo trazas de ceramida estaban presentes en tripomastigotes. Se determinó que el lípido del ancla de Ssp4 es también una ceramida de la misma estructura, la palmitoildihidroesfingosina, lo cual confirmaría que la ceramida libre se origina en el proceso de liberación de la Ssp4 al medio (Bertello *et al*, 1996, Mol. Biochem. Parasitol. 143-151). Este resultado abre la posibilidad de que la ceramida juegue un papel importante en la diferenciación y proliferación celular como se había sugerido para células de mamífero. Relacionado con esto habíamos encontrado que PI-PLC bacteriana no sólo libera glicerolípidos de los glicoinositolfosfolípidos sino también ceramida en el caso de glicoinositolfosfoceramidas (Lederkremer *et al* 1990, Eur. J. Biochem. 192, 337-345). La enzima endógena de *T. cruzi* tampoco discrimina el lípido ya que incubando inositolfosfolípidos constituidos por ceramida o un glicerolípido, se libera en los dos casos el lípido por incubación con membranas de *T. cruzi*. (Bertello *et al*, trabajo en realización). Por otra parte, la trans-sialidasa de formas tripomastigote (Pollevic *et al* 1991, Mol. Biochem. Parasitol. 47, 247-250) está anclada por un GPI constituido por dos lípidos diferentes, liso-1-O-hexadecilglicerol y N-palmitoildihidroesfingosina, con preponderancia de la ceramida (Agusti *et al*, 1997, Glycobiology, en prensa). Liso-1-O-hexadecilglicerol es el componente lipídico del ancla de la glicoproteína Tc85 de tripomastigotes. Encontramos que la Tc85 se libera al medio con el ancla glicolípida lo cual indica que en el «shedding» no interviene una PI-PLC, sino que se liberaría formando parte de vesículas (Abuin *et al*, 1996, Exp. Parasitol. 82,290-297). Es interesante que en las mucinas, que serían las glicoproteínas aceptoras de ácido siálico se encontró que cuando los epimastigotes diferencian a tripomastigotes metacíclicos el lípido del ancla glicolípida cambia de 1-O-hexadecil-2-O-palmitoildiglicerol a ceramida mientras que el oligosacárido no se modifica (Acosta Serrano *et al*, 1995, J. Biol. Chem. 270, 27244-27253). Dado que la mayoría de las mucinas de metacíclicos son liberadas por el parásito durante la invasión celular los autores sugirieron que este fenómeno estaría relacionado con un remodelamiento del lípido. Esto estaría de acuerdo con el hecho de que Ssp4 de amastigotes y la trans-sialidasa (SAPA) de tripomastigotes también tienen ceramida en el lípido del ancla. Sin embargo, también en epimastigotes, el glicoconjugado más importante de la superficie que es el lipopéptidofosfoglicano (LPPG) contiene una ceramida cuando se obtiene de parásitos en la fase estacionaria de crecimiento (4-5 días) pero se determinó 1-O-hexadecil-2-O-palmitoildiglicerol en el LPPG aislado de parásitos en la fase logarítmica (2 días) (Lederkremer *et al*, 1993, Eur. J. Biochem.). El LPPG, cuya estructura está bien caracterizada es el primer glicoinositolfosfolípido purificado, que presenta gran homología con las anclas de proteínas de membrana de

células eucariote (Lederkremer *et al*, Biochem. Biophys. Res. Commun., (1978), 85, 1268-1274; Eur. J. Biochem., (1990), 192, 337-345; J. Biol. Chem. 266 (1991), 23670-23675.

Es interesante señalar la presencia de galactosa en configuración furanósica en el LPPG. No obstante que la galactosa está extensamente distribuida en la naturaleza, sólo se encuentra en configuración piranósica en células de mamífero, por esta razón el huésped produce anticuerpos contra galactosa furanósica. El diseño de inhibidores de su biosíntesis es un área de investigación atractiva en progreso en nuestro laboratorio.

MR10. Trans-sialidasa y mucinas de *Trypanosoma cruzi* GUIDO D. POLLEVICK, MARIA L. CREMONA, JAVIER M. DI NOIA, CARLOS A. BUSCAGLIA, ALEJANDRO BUSCHIAZZO, DANIEL O. SANCHEZ, OSCAR CAMPETELLA Y ALBERTO C. C. FRASCH.

Instituto de Investigaciones Biotecnológicas, Universidad Nacional de General San Martín. C.C. 30, 1650 San Martín, Buenos Aires, Argentina. gpollevi@inti.edu.ar

Entre las moléculas involucradas en la adhesión y penetración del parásito *Trypanosoma cruzi* a células de mamífero, se ha identificado a la trans-sialidasa (TS), una enzima capaz de transferir ácido siálico de una molécula dadora a una aceptora. La presencia de ácido siálico es necesaria para la infección del parásito a la célula hospedadora, *T. cruzi* no puede sintetizar ácido siálico, sin embargo lo adquiere en su superficie por acción de la TS. La secuencia de aminoácidos deducida del gen que codifica para la TS de la forma tripomastigote muestra que está compuesta por dos dominios. La región C-terminal inmodulante que contiene unidades repetitivas de 12 aminoácidos cada una, llamada SAPA (Shed Acute Phase Antigen) que induce una fuerte respuesta humoral detectable en humanos y ratones poco tiempo después de la infección. La región NH₂-terminal, donde se localiza la actividad enzimática contiene cuatro secuencias parcial o totalmente conservadas de la secuencia consenso SXDXGXTW presente en neuraminidasas bacterianas. Actualmente hemos identificado una familia de varios genes homólogos de la TS. Algunos de ellos codifican para proteínas con actividad enzimática y otros para productos inactivos. En estos últimos, el cambio de una tirosina en la posición 342 por una histidina es suficiente para inactivar a la trans-sialidasa. Por experimentos de hibridización se detectaron en las cepas RA y CL Brener aproximadamente 60 genes codificantes para proteínas inactivas y similar cantidad para TS activa. A nivel de ARN mensajero se detectó la presencia de transcritos codificantes para productos activos e inactivos.

En tripomastigotes metacíclicos y epimastigotes el ácido siálico es incorporado por acción de la TS, mayoritariamente en proteínas de 35/50 kDa ricas en Thr y Ser, que son altamente O-glicosiladas constituyendo moléculas del tipo de las mucinas de mamíferos. En tripomastigotes de cultivo se han descrito este mis-

mo tipo de moléculas pero con un peso molecular aparente entre 60 y 200 kDa. Todas estas moléculas son las principales aceptoras de ácido siálico del parásito, hecho que las relaciona fuertemente con la invasión celular. En nuestro laboratorio hemos clonado el primer gen codificante para una proteína del tipo mucinas de *T. cruzi*. La proteína deducida presentó cuatro unidades repetidas con la secuencia T(8)KP(2), flanqueadas por un N-terminal con un probable péptido señal y en el C-terminal con una región compatible con un anclaje del tipo GPI como está descrito en las mucinas del parásito. A partir de este dato se describió una compleja familia de genes del tipo mucina, todos ellos con un pequeño tamaño entre 350 y 650 pb. Todas las proteínas deducidas a partir de estos genes, presentan en los primeros 24-28 aminoácidos y en los últimos 50 aminoácidos una alta identidad (entre 70 y 100 %), variando las regiones centrales tanto en secuencia como en tamaño. Se han podido establecer entonces dos grupos: uno con una región central compuesta por elementos repetitivos en tandem con la región consenso T(8)KP(2), variando en el número de estas repeticiones y el otro sin elementos repetitivos pero con una región central enriquecida en residuos de Thr, Ser y Pro. Análisis de northern blots presentan una gruesa banda de un tamaño de 1000 bases, tanto en epimastigotes como tripomastigotes.

Finalmente utilizando un anticuerpo monoclonal que reconoce específicamente los epitopes de carbohidratos de las mucinas de *T. cruzi* y un suero dirigido contra la proteína recombinante expresada a partir de uno de los genes clonados en un sistema bacteriano, por experimentos de inmunoprecipitación y western blot se correlacionó a esta familia de genes de mucinas como los codificantes de las mucinas descriptas en el parásito. También se demostró que cuando estos genes son expresados en sistemas eucariotes el producto obtenido se comporta como una mucina de mamífero. Financiado por SAREC (Suecia), el TDR/WHO y la Universidad de Buenos Aires.

Evaluación terapéutica y pronóstico de protozoosis

MR11. A chemiluminescence-based assay for the precise diagnosis and monitoring of the chemotherapy of chronic Chagas' disease. IGOR C. ALMEIDA¹, DIMAS COVAS², LEA M.T. SOUSSUMI², VERA L. PEREIRA-CHIOCCOLA³ AND LUIZ R. TRAVASSOS⁴.

¹Carbohydrate Research Centre, University of Dundee, Dundee, Scotland, UK (icalmeida@bad.dundee.ac.uk); ²Hemocentro de Ribeirao Preto, Ribeirao Preto, SP, Brazil; ³Instituto Dante Pazzanese and ⁴Universidade Federal de Sao Paulo, SP, Brazil.

A chemiluminescent (CL)-ELISA method, using a purified tripomastigote glycoconjugate (A&T antigen)(1) and an epimastigote preparation (EpEx antigen)(1), was developed aiming at a precise diagnosis of Chagas' dis-

ease in blood banks. Using a panel of 100 Chagasic sera (ChS) and 1,000 normal human sera (NHS), both antigens remarkable sensitivity, with the lowest reactive ChS giving a response about two times as high as that of the average reactivity of NHS + 10 standard deviations (SDs) (CL-ELISA cutoff). No reactivity with both antigens was found with sera from patients with other infections or autoimmune diseases. In contrast to EpEx, however, A&T showed to be highly specific since no cross-reactivity was observed with sera from patients with visceral and cutaneous leishmaniasis, and systemic mycoses. Also, a panel of 115 sera with inconclusive primary (IHA and ELISA) conventional serology (CS) for Chagas' disease was simultaneously tested in CL-ELISA with both A&T and EpEx. One hundred and one sera (87.8%) were negative with A&T; 95 sera (82.6%) were negative with EpEx. Fourteen sera (12.2%) gave positive reaction with A&T; 20 sera (17.4%) were negative for EpEx. None of the sera gave inconclusive result with both CL-ELISA tests. This panel was also tested with 8 conventional serology tests (1 HA, 1 IIF, 5 ELISAs and 1 Western-blotting), all based on epimastigote antigenic preparations. In this case, the number of inconclusive reactions varied from 7 (9%) to 68 sera (79.1%). We had previously reported (2) that nonspecific reactions are responsible for most of the discrepancy between CS and CL-ELISA. Indeed, the majority of inconclusive reactions in CS tests are due to either nonparasitic antigens, added as assay reagents (i.e. skim milk), or to nonspecific polyclonal B cell activation (2).

We have also been using the A&T CL-ELISA for monitoring the chemotherapy of patients with chronic Chagas' disease. In a recent study (3), we found that 58% of benznidazole-treated patients showed negative result with A&T CL-ELISA 36 months after the end of the treatment. In contrast, only 3 (5%) of the placebo-treated patients had a negative reaction with A&T. The CS (IIF, IHA and ELISA), however, was still positive for all patients despite a general decrease of the serum titres in the benznidazole-treated group. These results agree with our present observation that ca. 50% of a group of treated chronic patients had negative reactions with A&T CL-ELISA 3-5 years after the end of the chemotherapy. In contrast, the CS showed in all cases to be either inconclusive or positive. Whether the A&T-negative patients still have circulating parasites could only be assessed by xenodiagnosis and/or indirect hemoculture. So far no parasitemia has been detected in the A&T-negative patients. Therefore, we conclude that the A&T and EpEx CL-ELISA tests, assayed in parallel, can be introduced in blood banks for a reliable diagnosis of Chagas' disease. Moreover, the A&T CL-ELISA alone can also be used in monitoring the treatment of chronic Chagas' disease. Supported by WHO/TDR, Project no. 940244; and FAPESP (Brazil), Fellowship no. 96/4260-0.

1. Almeida, I.C., Covas, D.T., Soussumi, L.M.T. and Travassos, L.R. (1997) August issue, in press.
2. Almeida, I.C., Salles, Santos, M.L.P., Sabino, E.C., Saez-Alquezar, Oliveira, T.G. and Travassos, L.R. (1995) Mem. Inst. Oswaldo Cruz 90:72-74.

3. Andrade, A.L.S.S., Zicker, F., Oliveira, R.M., Silva, S.A., Luquetti, A., Travassos, L.R., Almeida, I.C., Andrade, S.S., Andrade, J.G. and Martelli, C.M. (1996) Lancet 348:1407-1413.

MR12. Avaliação da eficácia do tratamento da infecção chagásica: 15 anos de acompanhamento. ANTONIANA U. KRETTLI, ZELIA M. P. LUZ & GREICE KRAUTZ.

Centro de Pesquisas René Rachou, FIOCRUZ & Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 30190-002. FAX 55-31.295.3566; email <krettli@oraculo.lcc.ufmg.br>

O tratamento da infecção pelo *Trypanosoma cruzi* na fase aguda tem sido amplamente aceito e recomendado, inclusive como profilaxia nos casos de acidentes de laboratório, a ser feito o mais rápido possível. O tratamento de infecções crônicas recentes (crianças e adolescentes) é também preconizado, sendo eficaz em cerca de 60% dos casos, a julgar exames parasitológicos e de serologia convencional (SC) negativos. No entanto, tratar pacientes na fase crônica da infecção permanece tema controverso, por serem as drogas comercialmente disponíveis tóxicas e apenas parcialmente ativas. A resistência do clínico em tratar no ambulatorio o chagásico crônico assintomático, se deve ainda a dificuldade em se avaliar a eficácia da conduta e os custos risco-benefício. Nós liberados pelo Food and Drug Administration na América do Norte, a necessidade desses medicamentos tem gerado transtornos e dificuldades no tratamento de infecções agudas acidentais (nos EUA e Europa). Na tentativa de desenvolver métodos complementares mais práticos e confiáveis para monitorar a terapêutica específica e diagnosticar infecções crônicas, temos estudado diferentes testes serológicos, em paralelo com hemoculturas repetidas. Testes de hemoculturas e xenodiagnóstico são em geral negativos após terapêutica na presença de persistente SC positiva, dado interpretado como fracasso terapêutico. No entanto, com base em estudos experimentais em camundongos imunizados com antígenos específicos, mas nunca infectados, e de pacientes tratados, demonstramos que SC persistentemente positiva pode ocorrer na ausência de infecção. Como método serológico alternativo mais adequado para monitorar terapêutica específica, inicialmente usamos como antígeno tripomastigotas vivos nos testes de lise mediada por complemento (LMCo), de imunofluorescência indireta, positivos apenas nos hospedeiros infectados (J. Immunology, 1982; Trans. R. Soc. trop. Med. Hyg, 1982). Dificuldades técnicas na obtenção e manuseio de parasitas altamente virulentos e do teste de LMCo, resultaram em trabalhos para padronizar ELISA com antígenos de sobrenadante de culturas ishedadosi de tripomastigotas vivos, antígenos purificados inclusive a fração F2 (Rev. soc. Bras. med trop. 1993), além de antígenos recombinantes do *T. cruzi* (J. Clin. Microb., 1995) negativos em $\geq 30\%$ dos pacientes chagásicos tratados. Sua ausência é considerada indicativo de cura, mesmo se a SC permanece positiva. Para excluir possíveis parasitemias subpatentes

neste grupo, hemoculturas seriadas foram feitas usando método modificado, usando meio LIT (liver infusion tryptose), que consiste basicamente de lavagem e processamento rápido do sangue dos pacientes, e cultivo por até 4 meses. Hemoculturas assim processadas foram positivas em 94% dos pacientes nós tratados (Rev. Soc. Bras. med Trop, 1994) e em apenas 13% dos 146 tratados (pelo Prof. Cançado). Todos os pacientes negativos pelos testes de anticorpos líticos e/ou na ELISA com antígenos purificados foram negativos pelas hemoculturas seriadas. A clonagem e sequenciamento recentes do antígeno alvo do anticorpo lítico, a GP160, denominado ícomplement regulatory protein (Norris et al. 1996) deverá permitir o uso de peptídeos sintéticos em testes mais simples e comercializáveis em "kits" facilitando o controle de cura e teste de novos medicamentos anti-*T. cruzi*. A terapêutica ambulatorial dos cerca de 20 milhies de pacientes chagasicos assintomaticos é urgente para evitar aposentadorias precoces, implantes de marca-passos, e outras cirurgias dispendiosas, considerando que a vasta maioria de pacientes são carentes e dependem do sistema público de saúde coletiva. Auxílio financeiro-CNPq (Bolsas para AUK e GK).

MR13. Algunos aspectos de la serología convencional en la fase aguda y crónica de la enfermedad de Chagas. LUQUETTI, A.D.; TAVARES, S.B.N.; OLIVEIRA, R.A. Y RASSI, A.

Laboratorio de Pesquisa da doença de Chagas, Fac. Medicina, Universidade Federal de Goiás, POBox 1031, CEP 74001-970 Goiânia, Brasil.

Mucho se ha escrito sobre la serología en la enfermedad de Chagas. En la época actual se ha dado énfasis a nuevas tecnologías, en especial con el empleo de antígenos purificados, recombinantes y péptidos sintéticos por diferentes métodos. Este hecho genera angustia en los laboratorios de rutina que nunca llegan a alcanzar la tecnología de punta, la que demanda, además de aparatos especiales, un costo siempre mayor. El motivo de esta presentación es llamar la atención para ciertos aspectos de la clásica serología convencional, utilizando antígenos totales, por las técnicas clásicamente disponibles. Presentamos resultados obtenidos con 62 sueros provenientes de pacientes en la fase aguda de la enfermedad, así como 100 sueros de pacientes crónicos, bien caracterizados clínicamente y con examen parasitológico (xenodiagnóstico) positivo en el momento de la obtención del suero. El primer aspecto se relaciona a la serología en la fase aguda, existiendo discusión sobre la frecuencia de IgM anti-*T. cruzi*. En nuestra casuística encontramos títulos de 1/5 o mayores por IFI en el 93.5 % (58/62) de los casos, lo que viene a demostrar la utilidad de esta técnica. El segundo punto se refiere a la presencia de anticuerpos IgG anti-*T. cruzi* durante la fase aguda. Las mejores técnicas para su detección fueron la HAI y la IFI, siendo que, con la técnica inmunoenzimática, en general obtuvimos resultados negativos con evolución de la enfermedad de hasta tres semanas. En varios pacientes fue detectada IgA anti-

T. cruzi y presencia de factor reumatoide. En relación a los sueros en la fase crónica, con xenodiagnóstico positivo, es importante resaltar que en 3/100 todas las técnicas (así como el empleo de antígenos recombinantes) fueron negativas, hecho ya conocido por los especialistas. Los restantes 97 sueros tuvieron títulos positivos por ELISA, IFI, y HAI, con títulos variables, constituyendo un perfil particular para cada paciente, de importancia fundamental para la correcta interpretación del eventual seguimiento serológico post-tratamiento. Otro aspecto fue el hallazgo de IgM anti-*T. cruzi* en los sueros de pacientes crónicos (10 %) estando asociado a veces a la presencia del factor reumatoide (FR). La IgA específica fue encontrada en el 6 % de los sueros, sin relación con FR. Por último nos gustaría llamar la atención sobre la importancia de la correcta conservación de los sueros. En diferentes experimentos constatamos pérdida sensible de anticuerpos en sueros conservados a temperaturas superiores a (-) 12°, principalmente, en ELISA e IFI. Esta disminución fue siempre menos importante en la HAI. Esta pérdida de reactividad también se aplica al uso de antígenos recombinantes. Para el seguimiento de pacientes tratados, es fundamental conservar en buenas condiciones de almacenamiento una muestra del suero original, antes del tratamiento. Este suero será el punto de partida para todo tipo de comparación, y podrá ser incluido en los experimentos cada vez que se recoge una nueva muestra. En los casos tratados durante la fase aguda, y con exámenes parasitológicos secuenciales negativos, la serología se negativiza alrededor del año hasta tres años, en nuestra experiencia. En los casos crónicos de larga evolución, verificamos la existencia de tres grupos diferentes: aquellos con exámenes parasitológicos y serológicos positivos, indicando fracaso terapéutico, los que presentan xenodiagnóstico seriado negativo con serología persistentemente positiva y aquellos con serología oscilante. Estamos estudiando un grupo de pacientes crónicos no tratados, para verificar el grado de oscilación temporal en los títulos, para una mejor interpretación de aquel último grupo. En este sentido, monitorear la presencia de anticuerpos del paciente contra determinados antígenos recombinantes o por otros métodos como la quimioluminiscencia o la lisis mediada por complemento, puede acortar el tiempo de observación. Concluimos que la clásica serología convencional, bien manejada, puede dar excelentes resultados para un correcto diagnóstico serológico. Para el seguimiento de tratados, una combinación de técnicas podría dar mejor resultado. Basta aplicar la técnica correcta para cada circunstancia.

Inmunomodulación en *T. cruzi*

MR14. Efecto de la inmunointervención sobre los niveles de citoquinas en la infección experimental. BEATRIZ BASSO.

Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Córdoba

Ha sido demostrado que las citoquinas regulan la iniciación y el mantenimiento de la respuesta inmune. Asi-

mismo, ellas intervienen en la selección del tipo de respuesta y los mecanismos efectores que intervienen en la resistencia a los patógenos. Sin embargo, ciertas citoquinas, cuando se producen en exceso, pueden resultar perjudiciales. Es decir que todo depende del balance de citoquinas presentes en el hospedador infectado. Hasta el presente se han descrito tres tipos de células T cooperadoras: TH0, TH1 y TH2. Debido a los importantes efectos regulatorios que ejercen entre sí estas dos últimas poblaciones, como así también a la estimulación antigénica repetitiva que caracteriza a las infecciones microbianas, las enfermedades infecciosas a menudo presentan respuestas dirigidas preferencialmente hacia uno u otro fenotipo, TH1 o TH2, con la síntesis de citoquinas derivadas de cada una de ellas. Esta situación tiene profundas implicancias en la resistencia o sensibilidad a determinadas infecciones. Por ejemplo, en infecciones por *Leishmania major* y *Candida albicans* existe un predominio de la progenie TH1, que protege al huésped, resolviendo la enfermedad y, cuando predominan las citoquinas sintetizadas por TH2 la enfermedad es progresiva. En cambio, en infecciones por *Trichuris trichura* la respuesta TH2 es protectora y la TH1 inmunopatógena. Por otra parte, el shock séptico está asociado con incrementos sistémicos de citoquinas, que incluye TNF α , IL1 e IL6. El excesivo aumento de la concentración sérica de ellas induce una respuesta inflamatoria descontrolada, perjudicial para el organismo. Sin embargo, en la respuesta inmune específica estos mediadores cumplen importantes funciones en la limitación y eliminación de las infecciones, como así también en el aumento de la resistencia del hospedador.

En estudios realizados en nuestro laboratorio observamos que, en la infección experimental por *Trypanosoma cruzi*, existe un marcado aumento de las citoquinas pro inflamatorias como TNF α e IL6, acompañado de IFN γ e IL10, durante el período agudo de la infección, que llevan a la muerte del animal. Sin embargo, cuando los ratones son inmunizados con *Trypanosoma rangeli* (no patógeno para el hombre) previo al desafío con formas virulentas de *T. cruzi*, se ha observado una modulación en la síntesis y liberación de estas citoquinas, con un adecuado balance entre las mismas, cuyo resultado es la resolución de la infección. En el período crónico IFN γ permaneció aumentado, con normalización del resto de las citoquinas, incluida IL10. En contraste, en los animales sin inmunizar que lograron pasar a la cronicidad, los niveles de IL10 permanecieron elevados. El balance en la síntesis de IFN γ e IL10 en este esquema experimental, durante el período crónico, podría estar asociado con el control de la infección por parte del sistema inmune, estableciéndose un equilibrio huésped-parásito, sin consecuencias perjudiciales para el animal infectado. Así, en la Enfermedad de Chagas experimental, el balance de los mediadores inflamatorios y de las citoquinas en general estaría también relacionado con la severidad o resolución de la infección.

Un conocimiento más amplio del rol que juega la inducción o supresión de la síntesis de citoquinas por los microorganismos quizás pueda hacer posible diseños de estrategias de vacunación basados en una adecuada

modulación de citoquinas, que puedan suprimir la patología tisular asociada a la infección.

MR15. Antígenos parasitarios en la modulación de la respuesta inmune contra el *Trypanosoma cruzi*. ADRIANA GRUPPI

Inmunología - Dto Bioquímica Clínica - Fac Cs Químicas - UNC - Agencia Postal 4 CC 61 5000 Córdoba. E-mail: agruppi@bioclin.uncor.edu

La fase aguda de la infección con *Trypanosoma cruzi* cursa con una importante activación policlinal de linfocitos T y B coexistente con inmunosupresión. Estos fenómenos representan una estrategia del parásito para invadir al huésped. La infección con *T. cruzi* produce activación de clones de linfocitos B específicos para el parásito como así también una indiscriminada activación de otros clones con la consecuente producción de anticuerpos específicos para el *T. cruzi* y para otros antígenos, algunos de los cuales pueden ser componentes del huésped. Uno de los desafíos del estudio de la enfermedad de Chagas es la identificación de antígenos parasitarios y de componentes del sistema inmune que participan en la inducción de activación policlinal, como así también conocer los mecanismos que permitan explicar la coexistencia de activación policlinal e inmunosupresión.

Hemos observado que una fracción antigénica de pl 7-9 obtenida del citosol de epimastigotes del *T. cruzi* (denominada FI) induce la proliferación y diferenciación de células B murinas normales. FI es capaz de expandir proporcionalmente las dos subpoblaciones de linfocitos B: CD5+ y CD5-. La inmunoglobulina predominantemente producida por las células B estimuladas con FI, luego de 6 días de cultivo, fue IgM reactiva con actina, mioglobina, miosina, anhidrasa carbónica y tiroglobulina, pero no con FI. Además, hemos detectado un incremento de IgG1 y no se detectaron modificaciones en los niveles de IgG2 e IgG3. Este perfil de anticuerpos se correlacionó con los niveles y tipos de citoquinas detectadas, por ELISA, en los sobrenadantes de cultivo de las células estimuladas con FI como: IL-4, IL-10, IL-6 e IFN γ . No se detectó IL-2. La ausencia de IL-2 se correlaciona con la falta de proliferación de linfocitos T luego del estímulo con FI. Estudiamos comparativamente la respuesta de CMB de ratones infectados con tripomastigotes (Tp) del *T. cruzi* (Tulahuen) frente a FI. La respuesta linfoproliferativa frente a FI fue significativamente disminuida respecto de sus controles normales. En función de estos resultados y para tratar de dilucidar los eventos que permitan explicar la coexistencia de activación policlinal e inmunosupresión, analizamos la respuesta de CMB de ratones infectados con dosis de 500 a 100000 parásitos, obtenidas a distintos tiempos postinfección (pi), frente a mitógenos de células T (ConA) y células B (LPS). Las CMB de los animales infectados con mayor número de Tp tanto en el día 8 u 11 pi presentan una respuesta linfoproliferativa basal y frente a mitógenos muy disminuida, desde las 24 hs de cultivo, que se correlaciona con la presencia de células activadas, agregadas, con características de inmadurez y fragmentación de DNA. En cambio, en el día 8

pi la proliferación basal de CMB de animales infectados con bajas dosis de Tp está aumentada y el pico de activación es precoz respecto de los animales normales. Esta cinética de respuesta acelerada nos lleva a detectar supresión en los tiempos (3 días de cultivo) habitualmente estipulados para medir proliferación frente a estos mitógenos. Estos resultados nos indican que bajas parasitemias inducen cierto grado de activación en los linfocitos que les permiten proliferar espontáneamente y responder precozmente a un mitógeno; mientras que en los animales infectados con mayor número de parásitos las células se sobreactivan in vivo perdiendo la capacidad de proliferar; probablemente debido a una muerte celular programada (apoptosis) inducida por activación. Esta eliminación de clones, nos permitiría explicar la desaparición de la población de anticuerpos reactivos con FI que se observa durante la fase crónica de la enfermedad de Chagas, pero que está presente en la fase aguda de la misma (Zúñiga y col 1996, Reunión Anual SAPHYEP). Abrahamsohn y col (1995, J Immunol 155(8)3955) demostraron que la falta de respuesta producida durante la fase aguda de la infección con el *T. cruzi* se debe a una gran producción de óxido nítrico como así también a una disminución en la expresión de antígenos clase II del MHC sobre macrófagos. Trabajos recientes (Cell Immunol 178(1)1, 1997; Cancer Res 57(10)1823, 1997; J Immunol 158(10)4696, 1997) demuestran que el óxido nítrico es capaz de actuar sobre los linfocitos conduciéndolos a la apoptosis.

Estos datos analizados en conjunto nos sugieren que durante la fase aguda de la infección con el *T. cruzi* se produce una importante activación policlonal producida, entre otros elementos, por antígenos parasitarios mitogénicos y que, cuando estas células activadas se encuentran nuevamente con el antígeno o mitógenos no parasitarios son capaces de ir a la apoptosis ya sea a través de una muerte celular inducida por activación o por factores solubles liberados durante el proceso de activación.

MR16. TNF- α in murine *Trypanosoma cruzi* infection.
Y. CARLIER¹, C. TRUYENS¹, F. TORRICO¹, A. ANGELO-BARRIOS¹ and W. BUURMAN².

¹University of Brussels (Belgium) and ²University of Limburg (Maastricht, The Netherlands).

High levels of circulating TNF protein (monitored by ELISA) were found in male BALB/c mice acutely infected with *T. cruzi*, paralleling the kinetics of parasitaemia, though circulating bioactive TNF (monitored using Wehi cell bioassay) was not detected. Indeed, the plasma of acutely infected mice displayed high amounts of sTNF-R1 and II and of inhibitory activities against bioactive standard TNF (Wehi cell bioassay), indicating a possible neutralization of TNF biological activity by sTNF-R in blood.

Since circulating levels might not reflect the tissular situation, the productions of TNF and TNF-R were also studied in peritoneal and spleen macrophages harvested from *T. cruzi* infected mice. Though both TNF-R were detected, bioactive TNF could be also found in the

supernatants of cells collected during the acute phase of infection. LPS-stimulation of such cells increased the production of bioactive TNF without effect on that of TNF-R11, indicating that the macrophages of *T. cruzi*-acutely infected mice produced bioactive TNF and were primed for such production.

The role of endogenously produced bioactive TNF was studied by injecting TNF-neutralizing mAb (TN3), during the first 2 weeks of infection. Whereas this treatment reduced the levels of circulating TNF, parasitaemia and mortality of mice were considerably increased. The cachexia associated to the acute *T. cruzi* infection in mice (characterized by a weight loss of 20% mainly due to a body fat depletion) was also reduced by half after administration of TNF- neutralizing mAb.

Altogether, these results suggest that *T. cruzi* infection modulates the biological activity of endogenous TNF by regulating the production of sTNF-R and that the bioactive TNF available in vivo has a protective role against *T. cruzi* infection as well as a detrimental effect in inducing cachexia in mice.

MR17. Inmunopatología asociada a la expresión de moléculas de adhesión. SUSANA A. LAUCELLA.

Instituto Nacional de Parasitología, Dr. Mario Fatale Chabén, Av. Paseo Colón 568, 1063 Buenos Aires.

Uno de los aspectos característicos de la forma crónica de la enfermedad de Chagas es el desarrollo de una cardiomiopatía inflamatoria persistente que puede culminar en una insuficiencia cardíaca y muerte. En la génesis de la lesión inflamatoria, la interacción entre células inmunocompetentes, el endotelio, la matriz extracelular y los tejidos blancos serían importantes en la evolución de la enfermedad. El reconocimiento de antígenos del parásito por el sistema inmune del huésped resulta en la liberación de citoquinas y otros mediadores inflamatorios que juegan un papel preponderante en la activación de los mecanismos efectores tripanocidas pero que podrían también crear el medio adecuado para el desarrollo de la patología. Una de las formas en que actúan estos mediadores inflamatorios es regulando los niveles de distintas moléculas de adhesión celular (MAC). En el sistema inmune, las MAC controlan la interacción celular requerida para la activación de linfocitos por antígenos extraños, y dirigiendo la migración y localización de leucocitos hacia los sitios de inflamación. Se han aislado también formas solubles de varias MAC cuya liberación es afectada por los mismos estímulos que inducen la expresión de las formas celulares. La importancia de las MAC en la enfermedad de Chagas se sustenta en diversa evidencia experimental. Durante la etapa aguda de la infección murina con distintas cepas del *Trypanosoma cruzi* hemos demostrado que la expresión de la molécula de adhesión intercelular 1 (ICAM-1) es inducida en miocardiocitos en forma paralela a la acumulación de linfocitos infiltrantes y citoquinas proinflamatorias (IFN- γ , TNF- α , IL-6, IL-1). Asimismo, los niveles solubles (s-ICAM-1) se encuentran aumentados en el suero. Estos resultados sugieren la

participación de esta molécula en la infección aguda si bien resta aún por aclarar si existe relación entre este aumento en la expresión de ICAM-1 y los fenómenos de resistencia y/o patología en la infección con *T. cruzi*.

En la enfermedad humana, hemos demostrado que los pacientes chagásicos con distinto grado de severidad o estadio de la infección presentan un perfil diferencial de MAC solubles. Pacientes en etapa aguda de la infección presentaron altos niveles de s-ICAM-1, la molécula de adhesión vascular soluble 1 (s-VCAM-1), s-E-Selectina y s-CD44 lo que refleja una inflamación polisistémica y la liberación de citoquinas proinflamatorias. Durante la etapa crónica de la enfermedad, los niveles de s-VCAM-1 (molécula expresada en células endoteliales activadas) y s-P-selectina (expresada en plaquetas y células endoteliales activadas) se encuentran aumentados. Los niveles de s-P-Selectina se asociaron con grados más severos de compromiso cardíaco. La expresión selectiva de las MAC en la etapa crónica concuerda con una forma más órgano localizada de la enfermedad. La sobreexpresión de VCAM-1 y P-selectina podrían ser en parte responsables del proceso inflamatorio crónico. Nuestro trabajo sugiere la utilidad clínica de realizar mediciones seriadas de s-VCAM-1 y s-P-Selectina en pacientes chagásicos crónicos ya que su expresión diferencial en esta etapa de la enfermedad las convierte en buenos candidatos como indicadores diagnóstico y pronóstico. El bloqueo de la lesión inflamatoria irreversible de la cardiopatía chagásica constituye hoy un desafío a la investigación de la enfermedad de Chagas. La eficacia del tratamiento anti-inflamatorio por bloqueo de diversas moléculas de adhesión ha sido demostrado en procesos inflamatorios agudos como el Shock Séptico y Meningitis y crónicos como Artritis Reumatoidea y Esclerosis Múltiple. La identificación y caracterización de moléculas de adhesión de relevancia patológica en la evolución y pronóstico de la enfermedad de Chagas permitiría establecer potenciales vías de tratamiento anti-inflamatorio mediante la inhibición de las moléculas de adhesión comprometidas.

Diagnóstico de situación epidemiológica de las parasitosis

MR.18 Aspectos epidemiológicos de las parasitosis intestinales. DR. JUAN ANGEL BASUALDO.

Cátedra de microbiología y parasitología, Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad Nacional de La Plata.

La frecuencia de personas infectadas con los parásitos intestinales es la siguiente: ascariasis: 1.200 millones; uncinariosis: 900 millones; tricocéfalias: 900 millones; amebiasis: 500 millones; giardiasis: 200 millones; cestodiasis: 100 millones, (*Taenia saginata*: 45 millones, *Taenia solium*: 3 millones, *Hymenolepis nana*: 44 millones y *Diphyllobothrium latum* 9 millones) strongiloidosis: 100 millones; fascioliasis: 10 millones y oxiuriasis: 400 millones. La mayoría de las infecciones parasitarias intestinales llega al hombre por manos sucias, alimentos

mal procesados suelo o agua contaminada. La principal fuente de contaminación de las aguas destinadas al consumo son las deposiciones humanas y animales. Se realizó un estudio multicéntrico con la participación de hospitales públicos e instituciones privadas del país. El total de hombres estudiados fueron 560 y el de mujeres 594. Se detectó una o más especies de parásitos en el 57% de los estudiados. Los tres parásitos más frecuentes fueron *Enterobius vermicularis*, *Giardia intestinalis* y *Blastocystis hominis*. Con un porcentaje inferior al 10% se detectó *Hymenolepis nana*, *Ascaris lumbricoides*, *Strongyloides stercoralis*, uncinarias, *Taenia* spp y *Entamoeba histolytica*.

En estudios efectuados por nuestro grupo en la materia fecal de perros, colectadas de las plazas y parques de la ciudad de La Plata, se detectó que en el 78% de las plazas las materias fecales de perros, presentaban huevos de *Toxocara canis*, *Ancylostoma caninum*, *Trichuris vulpis*. De la totalidad de las calles de la ciudad se colectaron muestras de materia fecal se determinó que la tercera parte de las muestras presentaban *Toxocara canis*, *Trichuris vulpis* y uncinarias. Se realizó otro estudio, pero en este caso con perros que habitaban en casas de familia. De los 1.000 perros estudiados, el 79% presentaron una o más especies parasitarias en sus heces y el 21%, fueron negativos. Los parásitos que con más frecuencia aparecieron (*A. caninum*, *T. vulpis*, *T. canis*), son capaces de afectar la salud humana. Uno de los estudios poblacionales realizados se desarrolló en un asentamiento precario en la periferia de la ciudad de La Plata, a 15 Km del centro. La comunidad estaba integrada por trabajadores de una fábrica de ladrillos que viven junto a sus familias en el mismo predio fabril. La frecuencia de infección global por parásitos fue del 89%. Los parásitos detectados fueron: *Enterobius vermicularis* (42%), *Giardia intestinalis*, (26%) y *Blastocystis hominis* (66%), y protozoos comensales el 55%. Otros parásitos intestinales hallados con una frecuencia menor del 10% fueron: *Ascaris lumbricoides*, Uncinarias sp, *Strongyloides stercoralis* e *Hymenolepis nana*. En las muestras de tierra analizadas se halló *Giardia intestinalis*, *Toxocara canis* y *Ascaris lumbricoides*. Otro estudio fue realizado en tres poblaciones con diferentes condiciones socioeconómicas. Se analizaron tres muestras de 100, 101, y 91 niños entre 0 y 14 años de edad en un asentamiento precario, en un barrio suburbano y en el casco urbano de la ciudad de La Plata. Resultaron con infecciones parasitarias intestinales el 73%, 54% y el 35% respectivamente. *Giardia intestinalis* fue el de mayor prevalencia con el 34%, 22% y 10% respectivamente, seguido por *Ascaris lumbricoides* con el 22%, 8% y 0% e *Hymenolepis nana* con el 15%, 4% y 0% *Trichuris trichiura* 9%, 0%, y 0% respectivamente. *Blastocystis hominis* se presentó en el 48%, 32% y 25%. Con respecto al número de especies de parásitos hallados en las materias fecales en la población del asentamiento precario fue de 6 especies como máximo, en el barrio suburbano hasta 4 especies y en el urbano 3 especies. Los helmintos predominaron con respecto a los protozoos en la población que tenía las condiciones sanitarias y ambientales significativamente inferiores (48%, 13% y 0%).

MR19. Diagnóstico epidemiológico de un área endémica de Leishmaniasis en Salta, Argentina. S SOSA ESTANI, OD SALOMON, AO GOMEZ, M PERALTA, V COUTADA, L MEDINA, C FLORES, EL SEGURA y Sistema de atención Primaria de la Salud de Salta.

CEDIE/ANLIS "Dr. Carlos G. Malbrán, Ministerio de Salud de Salta, School of Medicine, Yale University.

El presente trabajo señala las características de esta enfermedad en la zona de mayor endemidad en la Argentina: En esta región tuvo lugar una epidemia, a mediados de la década de los años ochenta, y desde allí se continúan notificando el mayor número de casos en el país. El objetivo de este trabajo fue describir el perfil epidemiológico (prevalencia e incidencia) de la Leishmaniasis en un área endémica en Salta e identificar las conductas de riesgo para adquirir la infección, a fin de contribuir al control de la transmisión, al diagnóstico y al tratamiento de los pacientes. El área de estudio se localiza en la región noreste de la Provincia de Salta, Argentina (22°30' - 24°10' Sud, 63°10' - 64°25' Oeste) en 3 Municipios, Gral. Mosconi y Embarcación (Departamento San Martín), y Pichanal (Departamento de Orán). Posee aproximadamente 6400 km² y 40.000 habitantes. Se aplicaron 3 diseños de estudio: A. Estudio de Corte transversal para estimar prevalencia(P), B. Estudio de Cohorte en la misma población para estimar incidencia (I) de infección (Intradermoreacción de Montenegro-IRM- reactiva) y enfermedad (lesión activa), y C. de Casos-Control para identificar factores de riesgo. Entre Julio de 1990 y Julio de 1994 se visitó el área para la realización de a) un cuestionario socio-demográfico referido a estructura familiar, actividades y comportamientos laborales y/o domésticos que pudieran implicar riesgo, b) una encuesta sobre características de la vivienda y su entorno, c) un examen físico, de piel y mucosas nasal y bucal, d) intradermoreacción de Montenegro (IRM)(Weigler et al., *Am J Trop Med Hyg*, 44(3):260-71, 1991). Para el diseño de Casos-Control se encuestaron los casos que ocurrieron durante el período de estudio y se asignaron aleatoriamente 1:2 controles de la misma edad (± 5 años) y sexo entre los residentes de la misma localidad.

La IRM fue aplicada y leída en 7336 personas entre los meses de junio y octubre de 1990 (estudio de base). Se observó una P global de infección del 38_{0/100} con una tendencia de aumento significativo con la edad (test X²: 112.96, p<0.00001), y una P global de enfermedad de 1.8_{0/100}, con la tasa mas elevada entre los 50-59 años. La I de infección entre 1990 y 1992 fue de 4.5_{0/100} personas/año. La mayor tasa de I se observó en sectores rurales de Gral. Mosconi. En los niños menores de 10 años la tasa de I fue de 3.3_{0/100} personas/año. La I de Leishmaniasis tegumentaria fue de 0.8_{0/100} personas/año. El examen físico efectuado, durante los tres años de estudio, a 264 pacientes reactivos a la IRM reveló que 130 (49.2%) de éstos presentaron algún signo evidente (cicatriz y/o lesión). La forma clínica presente es la Mucocutánea, compatible con la caracterización del parásito efectuada en la zona como *Leishmania (Viannia) braziliensis*. Para evaluar los factores de riesgo se eva-

luaron 30 Casos y 60 Controles. Se observaron como factores de riesgo para adquirir Leishmaniasis, según se consideraron 1. Antecedentes laborales: el realizar actividades de ganadería (OR 4.64 IC 1.22-17.64), actividades fuera de la casa por más de 10 hs. (OR 2.35 IC 1.06-5.19) y dormir en el local de trabajo (OR 4.14 IC 1.28-13.43). 2. Hábitos extradomiciliarios: como realizar actividades domésticas en el monte (OR 3.69 IC 0.72-18.97), buscar agua (OR 3.79 IC 1.00-14.33), o ir a cazar (OR 4.00 IC 1.38-11.56). 3. Hábitos domiciliarios: como dormir fuera del dormitorio (OR 6.29 IC 1.70-22.45) o no combatir insectos con insecticidas u otra estrategia (OR 2.55 0.71-9.11).

Nuestro estudio demostró: I) que la transmisión en la zona bajo estudio retornó a su carácter endémico después de la epidemia de 1985. II) La existencia de la infección asintomática, III) que la incidencia en niños y la existencia de factores riesgo inherentes a la unidad del domicilio en la transmisión de la Leishmaniasis resaltan la ocurrencia y el riesgo de adquirir la infección en este local, VI) la necesidad de profundizar en aspectos bioecológicos, sociales y económicos que disminuyan el riesgo de adquirir la infección que aporten para el diseño de estrategias de control adecuadas.

MR20. Risk factors for American cutaneous Leishmaniasis in Santiago del Estero, Argentina: a retrospective case-control study. ZAIDA ESTELA YADON.

ANLIS "Dr. Carlos G. Malbrán", Velez Sarsfield 563. Buenos Aires.

A retrospective population based matched case-control study with two controls per case was carried out to identify the risk factors associated with Cutaneous Leishmaniasis (CL) in four contiguous departments of Santiago del Estero, Argentina. The study period extended from January 1990 to April 1994.

The study subjects consisted of 171 cases and 308 controls matched on age, sex and place of residence. Cases were identified from hospital records, kept by the areas primary health care workers and by asking subjects if they knew of others with similar scars or lesions. Controls were selected from houses located in the same cartographic sector as the index case (The smallest geographical unit of the census).

Information on risk factors was obtained using a standard questionnaire which included questions about socio-demographic aspects and activities of the study population. In addition, characteristics of the house such as material of the wall, roof, floor, windows, door, toilet facilities, and the number of rooms, bedrooms, and permanent residents were ascertained by the interviewer. Information on the peridomicile (animal enclosures and presence of animals), features around the house (location of the house in relation to source of water, agricultural areas, woodland, neighbourhood house and road) was also collected.

Univariate and multivariate analyses using conditional logistic regression were carried out to identify the risk factors independently and significantly associated with

CL. These included those that may increase the density of the sandflies inside the house (houses with three or less rooms (OR=4.4, 95% CI=1.4-13.8), houses with earth soil floor (OR=6.1, 95% CI=1.1-34.5), and hole(s) in the wall instead of window(s) (OR=8.0, 95% CI=2.5-25.5)); factors that may increase the density of sandfly around the house (presence of a pond within 150 metres of the house (OR= 15.1, 95% CI=4.5-50.1), presence of woodland within 150 metres of the house (OR=4.4, 95% CI=0.8-23.2), and existence of an agricultural area within 200 metres of the house (OR=5.2, 95% CI=1.5-18.4)); and factors that may facilitate the vector and human contact (sleeping in the backyard for four or more months (OR=10.0, 95% CI=3.4-29.6), collecting water (OR=13.2, 95% CI=2.7-62.8), bathing (OR=8.9, 95% CI=1.5-50.7), and working or helping in a crop area (OR=5.7, 95% CI=1.5-20.7)). The risk factors identified in this study imply that transmission in the study area occurs in the intradomiciliary, peridomiciliary, and extradomiciliary environments. This suggests that measures targeted at intra and peridomiciliary transmission such as spraying insecticide or house modification would reduce the transmission of CL in our study area.

MR21. Filariasis en Balderrama, Provincia de Salta. Aspectos Epidemiológicos, año 1996. MARIO ZAIDEMBERG.

Sistema de Atención Primaria de Salud de Salta.

El Programa Nacional de Paludismo que centraliza el diagnóstico de síndromes febriles en el NOA y NEA a través del examen de gota gruesa, desde hace más de 12 años detecta en forma casual entre 5 a 7 casos anuales procedentes de los departamentos San Martín, Orán y Anta, y es probable que haya subregistro de acuerdo a manifestaciones de profesionales que trabajan en el área de Diagnóstico de algunas zonas de la provincia. Por lo tanto, dadas las limitaciones de la información disponible, no se cuenta con los datos necesarios para hacer una aproximación a la identificación de la incidencia de filariasis en la provincia.

A fines del año 1995 en el paraje Balderrama, zona sur de la provincia, departamento Metán se detectó un agrupamiento de 3 casos de microfilariasis por *Mansonella ozzardi*. Este hallazgo llamó la atención al conocerse la población del lugar, estimada en 30 personas, por lo que se decidió llevar a cabo un estudio tendiente a caracterizar clínica y epidemiológicamente la enfermedad en la zona.

En su mayoría la población estuvo constituida por los jefes de familia, sus mujeres y esporádicamente algún niño. La población joven y de escolares residía desde hace unos 5 años en el periurbano de la ciudad de Metán, distante unos 10 km., y sólo se trasladaba transitoriamente los fines de semana a la zona. De tal forma se estudiaron 16 pacientes que residían permanentemente en Balderrama y 16 que lo hacían en Metán. Se realizó un examen clínico, toma de muestra de sangre y un cuestionario estructurado para ser tomado por entrevista personal. Se recolectaron muestras de dípteros

hematófagos adultos, y se capturaron larvas en la ribera del río Balderrama y de otros sitios como potencialmente criaderos. Las muestras de sangre se obtuvieron por punción capilar (gota gruesa y frotis y micro-hematócrito) y por punción de venas del codo para el método de Knott, pruebas serológicas para Chagas (Hemaglutinación indirecta y ELISA), VDRL para sífilis. El cuestionario requería información sobre edad, sexo, lugar de nacimiento, ocupación, hábitos de vida, residencia anterior, características de la vivienda y peridomicilio; estado de salud actual y de los últimos años. Se indagó sobre la presencia de signos o síntomas como artralgias, mialgias, adenopatías, edemas, fiebre, calambres, cefaleas, astenia, sensación de frío en los miembros inferiores, etc. Se consideró que estaban presentes cuando su duración era igual o superior a 30 días. Se confirmó la presencia de infección cuando uno de los 3 métodos empleados era positivo. Los datos del cuestionario se procesaron y analizaron con el programa Epiinfo 5.01. Se usó la prueba del chi cuadrado, M-H, para realizar análisis estratificado de posibles asociaciones estadísticas con un nivel de significación de 5%. Se detectaron 16 pacientes positivos, 50.0%. La gota gruesa y el método de Knott concordaron en todos los casos. El micro-hematócrito en 14 (el Índice de Kappa para este último fue de 0.88). De los 16 pacientes positivos, 12 vivían actualmente en Balderrama, 75% de los infectados. El análisis estratificado realizado de acuerdo a sexo, edad igual o mayor de 40 años y menor de 40, presencia de infección, procedencia de los pacientes, y ocupación, demostró que la edad mayor de 40 años, el trabajo rural y el vivir en Balderrama presentaron una asociación estadísticamente significativa con el riesgo de estar infectado. La presencia de signos y síntomas estuvo asociada significativamente al riesgo de infección, aunque fueron inespecíficos. Se identificaron ejemplares del género *Culicoides paraensis* y del género *Simulium*.

Son necesarios estudios a mayor escala para identificar exactamente las características del vector y del reservorio así como la dinámica de la transmisión; una población más numerosa contribuiría a aclarar los aspectos clínicos de esta filariasis.

Inmunomodulación en otras parasitosis

MR22. Inmunomodulación en Triquinosis. STELLA MARIS VENTURIELLO.

Cátedra de inmunología. Facultad de Farmacia y bioquímica. UBA. IDEHU-CONICET.

La respuesta del hospedador (H) a la infestación parasitaria es parte de un proceso de acomodación mutua que se ha desarrollado bajo una presión evolutiva y se manifiesta por la presencia prolongada del parásito (P) en el H durante largo tiempo, pese a una respuesta inmune activa.

Las parasitosis están caracterizadas por un *compromiso biológico* entre el P y el H permitiendo la sobrevivencia de ambos. Un gran número de mecanismos han sido

desarrollados para mantener o sobrellevar el equilibrio necesario para esta asociación H-P, tanto por parte del H como del P, donde la modulación de la respuesta inmune (Inmunomodulación) juega un importante rol de «equilibrio» entre los mecanismos inmunológicos de ataque y los mecanismos de escape parasitarios.

Los estudios inmunológicos de un modelo parasitario deben ser tomados en el contexto del ciclo evolutivo del P el cual envuelve un proceso dinámico de maduración y desarrollo con importantes variaciones inter e intraestadios.

Después de una infestación primaria por *T. spiralis* en un H habitual normal y permisivo, el P madura y se desarrolla al estado adulto, se desencadena una respuesta inmune (RI) celular y humoral con aparición de anticuerpos (Acs) y células de reconocimiento contra los diferentes estadios parasitarios: verme adulto, larva migrante o recién nacida y larva muscular. Se desencadena un proceso multifactorial que incluye varios isotipos de Acs, factores del complemento, mediadores solubles y diferentes poblaciones celulares, a pesar de lo cual la respuesta no es efectiva debido a los diferentes mecanismos de escape desarrollados por cada estadio P de la *T. spiralis*. Este proceso implica la Modulación de la RI del H para lograr el equilibrio H-P.

Entre estos mecanismos podemos citar: la reclusión anatómica por parte de la LM, eliminación de antígenos solubles con formación de inmunocomplejos circulantes, síntesis de Acs bloqueantes de los mecanismos inmunológicos efectores, eliminación de enzimas parasitarias que actúan sobre diferentes componentes solubles de la RI del H, variaciones antigénicas de la cutícula de la larva migrante, la inmunosupresión y la activación policlonal inespecífica de linfocitos B llevando al H a una hipergama-globulinemia esencialmente a IgE.

En conclusión la relación H-P en *Trichinella* es compleja porque ella implica varios sitios del organismo y estadios parasitarios de antigenicidad diferente. Se establece así una especie de competencia entre el H y el P, en donde el primero desarrolla una respuesta inmunitaria específica, el P cambia de estadio, de Ags de superficie y de localización escapando así a la respuesta protectora. Finalmente, el P se encapsula dentro de una fibra muscular donde reorienta el metabolismo celular de acuerdo a sus propias necesidades.

El estudio y entendimiento de cada uno de los mecanismos puestos en juego en toda relación H-P, no solo permitirá comprender la naturaleza del equilibrio H-P sino que fundamentalmente ayudará al desarrollo de métodos de diagnóstico y profilaxis más precisos y eficaces.

MR23. Estrategias de evasión en fasciola hepática. DIANA MASHI.

Departamento de Bioquímica Clínica, Parasitología y Bioquímica. Facultad de Ciencias Químicas. Universidad Nacional de Córdoba.

Los mecanismos de inmuno-evasión desarrollados por parásitos son efectivos para reducir el efecto dañino generado por el sistema inmune contra ellos. El pro-

pósito de los parásitos es desarrollar un nicho en el huésped en el cual sean capaces de sobrevivir y reproducirse, sin un significativo deterioro de la viabilidad del organismo infectado. Recientes avances en inmunoparasitología destacan los mecanismos generados en beneficio del parásito. Entre ellos se encuentran la generación de supresión de las respuestas de células T y B; la interferencia con el balance de las respuestas T helper 1 y T helper 2; la liberación de enzima secuestradoras de radicales oxigenados. Las estrategias generales de inmunosupresión por parásitos pueden ser directas o fortuitas a través de productos metabólicos tóxicos y son ampliamente usadas por el parásito para establecer la infección. La supresión de la función de células B y T puede ser asignada a la generación de células supresoras o al efecto inmunosupresor por la acción directa de productos del parásito sobre componentes inmunes. Por ej. Se ha demostrado que cinco polipéptidos de los productos excretores secretores del gusano intestinal *Nematospiroides dubius* causa una inmunosupresión generalizada de la proliferación de linfocitos T y B. Estos parásitos adultos regulan negativamente la producción de IL-9 e IL-10 de nódulos mesentéricos linfoides y causan reducción en la mastocitosis, permitiendo al parásito la sobrevida crónica. Pacientes infectados con *Trichinella spiralis* pueden modular la producción de anión superóxido, el cual podría deberse a un factor del nematodos que reduce los efectos antiparasitarios del estallido oxidativo. Extractos de *Ascaris suum* reducen las reacciones de hipersensibilidad de tipo demorada (HTD), la blastogénesis de células T e inhiben la IL-2, IL-4, IL-10 e IFN- γ por células T murinas. Por otra parte la manipulación del balance de las respuestas Thelper1 y Thelper2 a una respuesta menos efectiva, permite al parásito protegerse de la eliminación sin causar una inmunosupresión general que podría resultar en la muerte del huésped por patógenos secundarios oportunistas. *Dirofilaria immitis* produce un componente ES de 20 kDa el cual aumenta la respuesta de citoquinas tipo 2 y suprime las relacionadas de tipo 1. El nematode *Nippostrongylus brasiliensis* desarrolla un incremento en la producción de huevos y una disminución en la expulsión de gusanos adultos en presencia de IFN- γ e IFN- α , estas citoquinas interfieren con la producción de citoquinas tipo 2 las cuales son protectoras para el huésped. En *S. mansoni* la respuesta tipo 1 parece ser más efectiva para el clearance del parásito, sin embargo los huevos del parásito inducen una respuesta sistémica dominante tipo 2 la cual es menos efectiva para controlar la infección. Otro de los métodos usados por los parásitos para contraatacar los mecanismos del huésped es la generación de enzimas secuestradoras de los radicales oxigenados a los fines de evitar el efecto tóxico de los mismos. La glutatión transferasa (GST) es una enzima ubicua que se encuentra en casi todos los animales, y los parásitos helmintos no son una excepción. Aunque esta enzima es aparentemente responsable de funciones de la célula en general, esta podría funcionar como una proteína inumuno-evasiva en la infección por helmintos. Se ha demostrado la presencia de GST

en *Necator americanus*, y *Schistosoma mansoni*. Esta enzima podría funcionar como detoxificante de productos secundarios de la peroxidación de lípidos. Esto podría ser claramente un mecanismo muy importante para evitar los daños producidos por la ADCC y la degranulación por eosinófilos y mastocitos, reduciendo el impacto de los radicales reactivos en la interfase células inmunes-parásito.

Nosotros trabajamos con *Fasciola hepática*, trematodes hermafrodita, que durante su migración por peritoneo y penetración por el parénquima hepático libera un gran número de productos de excreción-secreción (PES). Algunos autores han descrito mecanismos de regulación de la respuesta inmune por estos PES, como el recambio del glicocalix del tegumento, el recambio y la excreción del complejo antígeno-anticuerpo del tegumento del parásito y la liberación de enzimas similares a papaína o catepsina B. Con estos antecedentes decidimos conocer la participación de los productos excretos-secretos de *F. hepática* en la modulación de la respuesta inmune celular y la generación de algún probable mecanismo evasor, estudiando particularmente su efecto sobre la modulación de la respuesta mediada por $Li\ T$ a antígenos del parásito y a antígenos no relacionados, la influencia de los PES de *F. hepática* en la modulación de las principales funciones de células accesorias peritoneales como así también la caracterización de estos productos. Se pudo demostrar que la inoculación de los PES de *F. hepática* en ratas induce en el bazo células T con actividad supresora de la respuesta de HTD a antígenos propios y extraños y que estos productos además, ejercen una acción supresora de respuesta proliferativa a mitógenos de células esplénicas de ratas normales, con participación en este fenómeno del peróxido de hidrógeno y el radical anión superóxido. Respecto al segundo punto también demostramos que durante la infección en ratas con metacercarias de *Fasciola hepática* se encuentran disminuidas la actividad fagocítica de células peritoneales y se encuentra alterada su capacidad presentadora de antígenos. Siendo responsable de la modulación negativa de estas funciones los PES del parásito. Para conocer si durante la infección con el parásito se observaban también esos fenómenos supresores descriptos, en una segunda etapa se correlacionaron durante los diferentes días post-infección, la modulación de la respuesta proliferativa a mitógenos con la variación en la producción de metabolitos oxigenados en especial el NO y también los hallazgos histológicos en el hígado de las ratas. También en esta etapa se observaron fenómenos supresores, ya que hubo una disminución transitoria de la respuesta proliferativa a Concanavalina A el día 7 post-infección, coincidente con los hallazgos histológicos que revelaron un infiltrado celular en el mismo día post-infección, como indicativo de la presencia del parásito en hígado. También se observó una disminución del NO en células peritoneales en los días 7 y 14 post-infección, lo que podría ser interpretado como un mecanismo del parásito para evitar la acción tóxica de este metabolito, responsable de la muerte de larvas en otros helmintos como *S. mansoni*. La causa de la supresión

transitoria observada el día 7 p.i en este caso, sería la participación del NO y del peróxido de hidrógeno como mediadores no específicos de supresión. Los PES también participaron de la disminución en la producción de NO por las células peritoneales tanto de ratas normales como infectadas. Tomando estos resultados en conjunto, se estima que en la fase temprana de la infección con *F. hepática* se genera una inmunosupresión transitoria mediada en parte por NO y peróxido de hidrógeno. Esta regulación negativa podría ser parte de una fase de inducción de un mecanismo inmunosupresor complejo, el cual favorece la sobrevivencia del trematode. La liberación de los PES durante su fase de migración por peritoneo, y comienzo de la penetración en hígado generarían en macrófagos peritoneales la disminución en la producción de NO, alteración en la fagocitosis y en la capacidad presentadora de antígenos, permitiendo al parásito evitar la respuesta inmune contra él. Por otra parte, al estudiar la composición de estos productos en geles de poliacrilamida al 10% con SDS se observó una composición glicoproteica compleja con un rango de bandas comprendido entre 14-150 kDa. El fraccionamiento de estas bandas en cuatro rangos y su posterior ensayo en cultivo de células esplénicas de ratas demostró que la fracción con PM comprendido entre 12-23 kDa ejercieron una acción supresora sobre la respuesta proliferativa a Con A. Finalmente en resultados recientes encontramos que el secuenciamiento del extremo carboxilo terminal de una proteína de 23 kDa (comprendida en el rango que resultó supresor), presentó homología con GST de *S. mansoni*. Esta enzima fue descrita ya en *F. hepática* por Howell y col. y Hillyer y col., sin embargo estos autores la obtuvieron a partir de homogenatos del parásito y no a partir de los productos de excreción-secreción como es nuestro caso. Por este motivo nos resultó interesante su purificación ya que abre expectativas sobre el posible rol dual de esta enzima en *F. hepática*. Posiblemente podría ejercer su actividad detoxificante en el parásito y de ese modo evitar la acción tóxica de metabolitos tales como el NO, siendo una molécula inmuno-evasora.

MR24. Inmunopatología en Leishmaniasis cutánea Americana. FELIX J. TAPIA

Instituto de Biomedicina, Facultad de Medicina,
Universidad Central de Venezuela, Apartado
4043, Caracas 1010A.

La leishmaniasis cutánea americana (LCA) constituye un excelente modelo para investigar los extremos de la relación hospedador/parásito, al conformar un espectro de enfermedad con características clínicas, histológicas e inmunológicas diversas. En un extremo del espectro se sitúa la leishmaniasis cutánea localizada (LCL) caracterizada por una inmunidad celular efectiva que tiende a eliminar al parásito, y en el otro extremo la leishmaniasis cutánea difusa (LCD) o forma diseminada, la cual se identifica por un estado de anergia selectiva que la incapacita a reaccionar frente a los parásitos *Leishmania* (Convit y col., 1972; Convit & Pinardi, 1974; Castés y col., 1983, 1984). Una tercera entidad,

la leishmaniasis mucocutánea (LMC), caracterizada por lesiones destructivas de las mucosas oral y nasofaríngea, está generalmente asociada con una inmunidad celular exacerbada (Castés y col., 1983, 1988).

Los resultados de varios años indican que entre las tres formas clínicas de la LCA existen diferencias a nivel de las células epidérmicas, linfocitos T, patrón de citocinas e isotipos de inmunoglobulinas presentes en la lesión. El conocimiento de los mecanismos de regulación de la respuesta inmunitaria en piel, el cual le asigna a la epidermis una función determinante en dirigir la direccionalidad y especificidad del anidamiento del proceso inflamatorio, nos ha permitido postular que fallas a nivel de las señales accesorias provenientes de la epidermis pueden determinar el tipo de respuesta inmunitaria (Tapia y col., 1994a, 1996a,b).

En 1985, nuestro laboratorio comenzó a estudiar la respuesta inmunitaria en la lesión leishmánica (Modlin et al., 1985). Varias investigaciones nos permitieron demostrar como fallas a nivel de las señales accesorias de la epidermis pudieran estar asociadas con el estado de anergia selectiva que se observa en los pacientes con LCD. Estos defectos a su vez, desencadenan respuestas inmunitarias defectuosas e inmunopatología (Tapia y col., 1994a,b, 1996). Además, demostramos que los patrones de citocinas en LCL, LCD y LMC son del tipo Th1, Th2 y mixto respectivamente (Cáceres-Dittmar y col., 1993). Recientemente, evidenciamos que los depósitos de inmunoglobulinas en la lesión respetan a los isotipos asignados a las respuestas Th1/Th2 con predominio de IgG2 en LCL y IgG4/IgE en LCD (Hernández y col., 1995).

Referencias

- Cáceres-Dittmar, G., Tapia, F.J., Sanchez, M.A., Yamamura, M., Uyemura, K., Modlin, R.L., Bloom B.R., Convit, J. Clin. Exp. Immunol. 91 (1993) 500-505.
- Convit, J., Pinardi, M.E. and Rondon, A.J. (1972) Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 66, 603-610
- Convit, J. and Pinardi, M.E. (1974) In Trypanosomiasis and Leishmaniasis with Special Reference to Chagas' Disease. Ciba Foundation Symposium 20, pp 159-166, Elsevier Excerpt Med, North Holland.
- Castes, M., Agnelli, A. and Rondon, A.J. (1983) Clin. Immunol. Immunopathol. 27, 176-186.
- Castes, M., Cabrera, M., Trujillo, D. and Convit, J. (1988) J. Clin. Microbiol. 26, 1207-1213.
- Hernandez, I.S., Cavallera, E., Cáceres-Dittmar, G., Sanchez, M.A., Rondón, A.J., Tapia, F.J. 9th International Congress of Immunology, San Francisco, EEUU July 23-29, 1995.
- Tapia, F.J., Cáceres-Dittmar, G., Sánchez, M.A., Fernandez, C.T., Rondon, A.J., Convit, J. Exp. Dermatol. 3 (1994) 17-22.
- Tapia, F.J., Cáceres-Dittmar, G., Sanchez, M.A. Immunol. Today 15 (1994) 160-165.
- Tapia, F.J., Cáceres-Dittmar, G., Sanchez, M.A., Fernandez, A.E., Convit, J. En: "T Cell Subsets and Cytokines Interplay in Infectious Diseases", Behbehani, J. & Chugh, T.D. (eds), S. Karger AG Publishers, 1996, Basilea, Suiza, pp.79-90.

Transmisión congénita

MR25. Infección chagásica en embarazadas, aspectos obstétricos y perinatales. Infección congénita, estrategia para la detección de niños infectados congénitamente. BLANCO S. B., ²SEGURA E.L.

¹Servicio Nacional de Chagas, ²ANLIS del M.S. y A.S. de la nación y Ministerio de Salud de Tucumán.

El objetivo de este trabajo es la detección temprana, por procedimientos adecuados a las condiciones locales, de los niños infectados congénitamente por *T. cruzi*. Comprende la detección de la embarazada chagásica, el seguimiento clínico y serológico de su hijo y la vigilancia entomológica de la vivienda. El protocolo de estudio de las embarazadas, comprendió un estudio comparativo de las condiciones obstétricas y perinatales en gestantes chagásicas y un grupo control.

En 28 meses de funcionamiento de los procedimientos en la maternidad pública provincial de Tucumán, se estudiaron con dos reacciones serológicas (Hemoaglutinación Indirecta y ELISA) 16842 embarazadas, encontrándose una prevalencia de 5.5%. Se observó que la enfermedad de Chagas en la embarazada en Tucumán, no debe ser considerada de alto riesgo perinatal. Los hijos de madre chagásica, se estudiaron con Strout y serología, se realizó una curva serológica, con un punto entre el nacimiento y los 5 meses de edad y otro desde los 6 meses y hasta el año de edad. De 532 niños estudiados, se encontraron 36 niños infectados (6.76%), 20 parasitológicamente (incidencia histórica) y 16 por persistencia de anticuerpos después de los seis meses de vida. Los niños detectados fueron tratados con Nifurtimox o Benznidazol.

Concluimos que el seguimiento serológico permitió detectar casi el doble de los casos antes del año de vida del niño. El diseño fue aplicado por la Maternidad, descentralizando el seguimiento a los Centros periféricos de Salud, y fue posible de realizar sistemáticamente, comprobándose la eficacia del mismo y la aceptabilidad de la transferencia de la estrategia.

MR26. Foeto-maternal relationship in experimental Chagas' disease. Y. CARLIER, S. MARQUES DE ARAUJO, M.T. RIVERA, A. EL BOUHDIDI, C. TRUYENS.

Laboratory of Parasitology, Faculty of Medicine, University of Brussels (ULB, Belgium).

Previous studies of our lab. indicated that offspring of chronically *T. cruzi*-infected mice exhibited foetal growth retardation and displayed higher parasitaemia and mortality rate than offspring of uninfected animals when infected two months after birth.

This latter effect was reversible, *T. cruzi*-specific and depended on both prenatal (placental) and post-natal (breast milk) maternal influences. Such features highly suggested the role of immune factors transferred from mothers to their young. Other experiments indicated that

maternal antibodies could be involved in such worsening of offspring infection. Uninfected mice received either serum from infected animals or purified *T. cruzi*-specific antibodies during gestation and lactation periods. When infected, offspring of such treated mice exhibited higher infection levels than young of control animals having received normal serum or unrelated immunoglobulins.

Chronically infected and pregnant mice produced higher levels of TNF- α , a cytokine known to be harmful to foetal growth. Moreover, the transcription of the TNF- α gene was shown to be increased in cells of foetuses from infected mothers and, after birth, such offspring was primed to produce higher levels of TNF- α . This indicated a materno-foetal transfer of parasitic priming factor(s) and the possible involvement of increased TNF- α endogenous production in the higher mortality rates observed in infected offspring, since administration of high doses of exogenous TNF- α also increased lethality of acutely infected mice.

Altogether, these results highlight the occurrence of some harmful materno-foetal relationship in mice chronically infected with *T. cruzi* during pregnancy.

MR27. Enfermedad de Chagas congénito: clínica, diagnóstico y tratamiento. HÉCTOR FREILIJ

Laboratorio de parasitología y Enfermedad de Chagas «Hospital de niños Ricardo Gutiérrez Buenos Aires-Argentina»

La enfermedad de Chagas congénita presenta características precisas por lo que las autoridades sanitarias, obstetras y pediatras, deberían prestar gran atención.

- El diagnóstico serológico en las embarazadas está establecido en las Normas Nacionales de atención Perinatal.

- El diagnóstico en el niño durante el período perinatal y los primeros meses de vida por métodos parasitológicos es sensible, específico y de muy bajo costo.

- La respuesta terapéutica iniciada en los primeros meses de vida, tiene una eficiencia cercana al 100% garantizando curación clínica y parasitológica definitiva.

- Esta entidad médica se observa tanto en zonas epidémicas como en áreas urbanas.

Una madre con infección crónica (a diferencia de otras infecciones intrauterinas) puede transmitir este protozoo por vía transplacentaria en uno o varios embarazos. La infección intrauterina oscila entre el 2 y el 5% de los niños nacidos de madre con infección chagásica crónica. Este porcentaje es mayor si la madre adquiere esta infección durante la gesta, o si tiene conjuntamente el virus de la inmunodeficiencia. La infección del embrión o feto, produce distintos grados de morbilidad: aborto, prematuridad, bajo peso, diferentes signos y síntomas o lo que es más común un niño infectado y asintomático. En nuestro Laboratorio hemos diagnosticado y asistido a 83 pacientes, con los siguientes hallazgos: asintomáticos 48, hepatosplenomegalia 19, sepsis 7, meningoencefalitis 4, hepatitis 3, miocarditis 3, anemia hemolítica 2. Seis niños nacieron de madres con HIV y Enfermedad de Chagas, 4 de ellos adquirieron el *T. cruzi*, uno fue asintomático y los otros tres pre-

sentaron muy severas manifestaciones clínicas. Los pacientes fueron divididos por edades al diagnóstico, grupo A: < de 6 meses; grupo B: \geq de 6 meses. El diagnóstico parasitológico fue realizado por Microhematocrito (MH), Xenodiagnóstico (Xd) e inoculación al ratón lactante (IRL). La sensibilidad fue para A: MH 97%, Xd 94% e IRL 81%; para B: MH 60% Xd 80%, IRL 40%. En cuanto al diagnóstico serológico, en el grupo A, es importante destacar que el 23 % fueron negativos para dos técnicas (aglutinación directa, Hemaglutinación) y en el grupo B todos fueron positivos por las dos técnicas. El tratamiento fue realizado con Nifurtimox a 10-12 mg./kg./d, 60 días. El criterio de curación fue: todo niño que presentara dos pruebas serológicas negativas con 6 meses de intervalo, luego de finalizado el tratamiento. De acuerdo a la edad del inicio del tratamiento la curación obtenida fue: < 12 m 98 %; 12-18 m 90 %, 19-24 m 40%, > 2 años 10%.

Conclusiones:

- a) Estudiar todos los hijos nacidos de madre chagásica.
- b) En lactantes menores de 6 meses el diagnóstico de infección congénita, debe basarse en pruebas parasitológicas (MH), mientras que la serología convencional es útil en niños mayores de 6 meses.
- c) Si en el período perinatal el MH fuera negativo debe realizarse serología a partir del 6º mes.
- d) El tratamiento es más eficaz cuanto más cercano al nacimiento se inicia.

Freilij H. and J. Altcheh. 1995. Congenital Chagas disease: diagnostic and clinical aspects. Clin. Infect. Dis. 21:551-555.

MR28. Aspectos epidemiológicos de la transmisión congénita en Salta, 1997. MARIO ZAIDEMBERG.

Sistema de Atención Primaria de Salud de Salta.

Desde el año 1980 hasta la actualidad, se detectan casos de Chagas congénita en la provincia de Salta. Su diagnóstico ha ido en aumento en forma progresiva teniendo en cuenta el mayor conocimiento de la existencia de la enfermedad por parte del equipo de salud. En la década del 80, se diagnosticaron 55 casos; en su mayoría, el diagnóstico se realizó en el Servicio de Neonatología del hospital Materno-infantil de Salta, centro de referencia obstétrico-neonatal de la provincia. Allí, durante bastante tiempo aunque con altibajos, se realizó el diagnóstico sistemático de la embarazada chagásica. El mismo se efectuaba con un par serológico que incluía Hemaglutinación indirecta e Inmunofluorescencia indirecta; también se utilizó la reacción de Aglutinación directa, la determinación de Inmunoperoxidasa. Con posterioridad, se fueron diagnosticando en hospitales del interior de la provincia. Para la misma época, en el interior se habían detectado entre 8-10 casos. Entre los años 1987-1988 se realizó una experiencia en tres áreas operativas del interior: Gral. Güemes, Tartagal, Orán y Salta capital. La misma consistió en incorporar a la actividad de captación y seguimiento de embarazadas por parte de la estructura de Atención Primaria de la Salud mediante los agentes sanitarios, la determinación de las 2 pruebas serológicas para Chagas. Una vez detectada, se derivaba a la embara-

zada al centro de salud del área u hospital de referencia. En caso de ser reactiva la embarazada, los agentes sanitarios incorporaban en un panel ad-hoc de su sector de trabajo, una bandera que identificaba la situación materna y hacían el seguimiento hasta el parto. A partir de este momento, al recién nacido se le practicaba una determinación serológica inicial y microhematócritos seriados en caso de tener clínica compatible. En caso de ser negativos los exámenes parasitológicos, al RN se le practicaban determinaciones serológicas al 2o., 4o. y 6o. mes de vida. En los dos años que hubo un seguimiento cercano de la experiencia, la incidencia de Chagas congénita fue de 0.9%. La misma fue baja en relación a la única experiencia sistemática realizada en Salta (4.0%), y atribuible fundamentalmente a un seguimiento irregular con una alta tasa de pérdidas maternas, alrededor del 70%. El análisis de este resultado, tuvo que ver con aspectos relacionados básicamente con la crisis del sistema de salud que operó en esos años, que incluyó medidas de fuerza que limitaron en más del 60% la capacidad operativa del sistema durante ese período.

Desde 1990 a 1996, a pesar de una notificación incompleta, el número de casos diagnosticados prácticamente se ha duplicado. Así, en diversas áreas operativas del interior como Cafayate, Rosario de Lerma, Chicoana, Guachipas, Cachi, Embarcación, Salvador Mazza, Tartagal, Orán, Metán, en este período diagnosticaron casos congénitos. A diferencia de la primera década, en que se diagnosticaron casos principalmente en los primeros meses de vida, en la actualidad la detección se hace en los primeros años de vida. Esto es posible, a que en las áreas de referencia desde hace más de una década, el índice de infestación triatomínea domiciliar es, en promedio, inferior al 2%. Esto indica, que en las áreas puede identificarse en primer lugar la condición de no infestación de las viviendas de los niños, la serología materna y luego el seguimiento efectivo de los lactantes hijos de madre chagásica.

Las perspectivas de la enfermedad provincial, aún cuando persistan zonas de riesgo entomológico, mientras se implemente la vigilancia en forma sistemática en las áreas rurales, son buenas. Luego, la transmisión materno-fetal del *T. cruzi* se irá constituyendo en el factor principal de la urbanización de la enfermedad en la población joven de los centros poblados de la provincia. Esto, está siendo confirmado de acuerdo a resultados preliminares de encuestas serológicas en escolares residentes de la ciudad de Salta (no publicado).

Aspectos socioeconómicos de las parasitosis

MR29. Análisis económico de programas de control: costos y asignación de recursos. MARÍA LAURA ESQUIVEL¹, SERGIO SOSA ESTANI² Y ELSA L. SEGURA²

¹Johns Hopkins University, School of Hygiene and Public Health; ²CEDIE - ANLIS Dr. Carlos G. Malbrán

La escasez de recursos impone la necesidad de hacer elecciones. Esto implica que hay que encontrar mecanismos para asignar esos recursos escasos de modo de lograr su utilización óptima. La esencia del análisis económico es la comparación de cursos de acción alternativos. Para las actividades, productivas o de consumo, del sector privado, la guía para la asignación de recursos está dada en el mercado por medio del sistema de precios relativos. Para las actividades del sector público, en las que usualmente se producen una o varias de las llamadas «fallas de mercado», esa asignación requiere técnicas de decisión, las cuales representan sólo una herramienta más en el proceso de toma de decisiones. A pesar de la importancia de otros factores, la estrategia preferible es usualmente aquella que produce el mayor impacto para un nivel dado de gasto. Este principio es la base del análisis sistemático de la asignación de recursos (análisis costo-beneficio (ACB), costo-efectividad (ACE), y costo-utilidad (ACU)). Esas técnicas son mecanismos que sirven para juzgar la eficiencia de los programas, dando una perspectiva comparativa de la utilidad relativa de las intervenciones. La diferencia entre ellas radica en la forma en que se expresan los efectos de los programas: valores monetarios, indicadores de efectividad o de utilidad (DALYs, QALYs). Estas tres técnicas no son excluyentes, y cada una de ellas presenta ventajas y desventajas: si bien ACB permite comparar programas con distintos objetivos, requiere valorizar tanto los costos como los beneficios en términos monetarios (¿cuál es el valor de la vida?) y elegir una tasa de descuento apropiada (análisis de sensibilidad). El ACE no requiere valorar los beneficios en términos monetarios (lo que implica determinar un indicador de efectividad adecuado que refleje todas las consecuencias de las distintas alternativas), pero sólo permite comparar programas con objetivos similares. Por último, si bien teóricamente las medidas utilizadas en el ACU incorporan todos los componentes que hacen al beneficio real de las actividades, es necesario determinar una medida de utilidad adecuada, válida y medible.

Por otro lado, la utilización de estas técnicas enfrenta diversos problemas operativos: es frecuente que la información sobre costos sea incompleta o inexistente, o que sea difícil asignar los costos conjuntos a las distintas actividades. Otro problema es la omisión de los costos soportados por las familias o comunidades cuando el análisis no tiene una perspectiva social. Los efectos o impacto de las actividades pueden ser difíciles de predecir o de medir. Hay también problemas para medir los beneficios intangibles, para lo cual se aplican usualmente el enfoque del capital humano o de «willingness to pay». Cuando los costos o los beneficios, o ambos, se producen durante sucesivos períodos de tiempo, es necesario determinar cuál es la tasa de descuento apropiada para calcular su valor presente y aplicar la técnica de ACB. Por su parte, ACE calcula el costo promedio sin tener en cuenta la escala, por lo cual es necesario realizar análisis incremental. Por último, es necesario tener en cuenta la presencia de externalidades, economías de escala y economías externas.

Como ejemplo de un inicio de análisis económico, el Proyecto María (Am J Trop Med Hyg, 46(4): 444, 1992) demostró que la vigilancia realizada mediante la estrategia de APS con tecnología apropiada (TA) tuvo un costo directo 3.5 veces menor a la estrategia con el programa de organización vertical. Esta información debería completarse con estimaciones de costos y beneficios indirectos para poder determinar el verdadero impacto desde una perspectiva social. Estimando el número de infectados y enfermos chagásicos que precisan atención médica, se gastarían en el país, en el sistema Público, alrededor de \$ 70.000.000 por año (costo de una consulta por paciente \$30), siendo este un costo parcial que no considera tratamientos o estudios especiales. Esto significa 4 veces el costo directo anual para las actividades de control y prevención de la transmisión de Chagas.

MR30. Particularidades sociales y económicas de la hidatidosis y otras zoonosis parasitarias en la patagonia argentina. JORGE ALFREDO IRIARTE

Departamento Zoonotoponosis del Sistema Provincial de Salud. Moreno 555, (9103) Rawson, Chubut.

En la dilatada extensión de la Patagonia Argentina que con sus 787.054 km² cubre casi el 25 % de la superficie total del país, pastaban, según la encuesta Nacional Agropecuaria del año 1995 algo más de 9.000.000 de laneros que directa o indirectamente brindaban sustento económico a aproximadamente el 25 % de sus 1.478.138 habitantes (Censo Nacional de Población y Vivienda '91).

La hidatidosis, considerada la zoonosis más importante de esta región de la República Argentina, cuenta con una serie de características socioeconómicas que, de un tiempo a esta parte, vienen siendo observadas con gran interés por todos aquellos que desde distintos ámbitos técnicos y científicos intentan controlar esta peligrosa patología que, término medio y antes de la implementación de Programas Provinciales de Control, alcanzaban una prevalencia superior al 1% en niños en edad escolar en la mayoría de los establecimientos educativos patagónicos.

Sabemos que la hidatidosis, que no sólo afecta al ganado sino también al hombre, se contrae al ingerir alimentos, agua o tierra contaminados con huevos de la tenia *Echinococcus granulosus* cuyo hospedero definitivo, entre otros, es el perro.

Este trabajo intenta analizar las particularidades sociales y económicas que hacen a la vigencia de ésta zoonosis endémica para la región, zoonosis que como se recordará tiene en la secuencia oveja - perro - hombre su trilogía de sustentación y en la ancestral costumbre del hombre de campo de alimentar a los perros con vísceras afectadas por la enfermedad, su escollo más difícil de sortear.

El documento plantea también una serie de aspectos ligados a otras zoonosis, principalmente los relacionados con el elevado grado de urbanización que se está alcanzando en la provincias patagónicas y que podrían

estar trasladando a sus ciudades y pueblos patologías que durante muchas décadas pertenecieron exclusivamente al ámbito rural.

MR31. Chagas, mujer y derechos humanos. El caso de la provincia de Buenos Aires. MARÍA CRISTINA LINCHETTA.

Cátedra de Derecho Político. Fac. de Ciencias Jurídicas y Sociales. Universidad Nacional de La Plata.

«Suelen decir los hombres prudentes, y no a bulto ni sin mérito, que quien quiera ver lo que ha de ser, que considere lo que ha sido; porque todas las cosas del mundo tiene en todo tiempo su correspondencia con los antiguos tiempos. Lo que procede de que, al ser aquellas realizadas por los hombres que tienen y han tenido siempre las mismas pasiones, resulta de necesidad que les siga el mismo efecto.» (Nicolás Maquiavelo, Discorsi, III, 43).

La distribución de la riqueza entre las naciones, ha provocado y provoca una, cada vez más, acentuada asincronía entre lo económico y lo social. Se ha dicho que el Norte se extiende hacia el Sur, al propio tiempo que la Periferia -el Tercer Mundo, globalización mediante- penetra en las viejas sociedades industrializadas. Tal situación ha generado una degradación general de las condiciones de vida. Siendo una de las más castigadas, junto con la pobreza y el desempleo, la protección social.

Ante esta normalidad, criterios derivados de la bioética, que supone la priorización de la calidad de vida, revitalizan la problemática de la Salud, considerada como una forma de vida -éticamente considerada- en esta secuencia finisecular. Más allá de la problemática económico-financiera que pareciera guiar la razón de ser de gobernantes y gobernados, criterios de justicia y moral, obligan, entonces, a detenerse y repensar en pro -como dijo Juan Pablo II- de una cultura de la igualdad.

Desde la óptica de LA MUJER y de la serie de discriminaciones que padece -sobre todo en Latinoamérica- nuestro tema fue abordado en virtud de la consagración constitucional del derecho a LA SALUD y a la no discriminación. Institucionalización ésta que no lleva como lógico correlato la erradicación de las enfermedades, tampoco las endémicas, entre ellas el Chagas; como así tampoco, garantiza el trato igualitario en igualdad de situaciones. De modo que ello, significa casi someter a la condición de proscriptos a quienes lo padecen, a la par que aumentar la vulnerabilidad de la mujer, de no mediar acciones positivas que protejan al género.

Estas palabras no nacen de una apreciación particular o antojadiza, sino que constituyen uno de los corolarios a que se arribara en la Cumbre Mundial para el Desarrollo Social (Copenhague, marzo de 1995). Vale decir, la necesidad vital de celebrar un nuevo contrato social como modo de erradicar la pobreza, el desempleo y la injusticia social.

Boutros Ghali, en uno de los discursos pronunciados en la mencionada Cumbre, sostuvo que «No existe ningún grupo que ilustre estos tres temas de la confe-

rencia mejor que las mujeres. El porcentaje más alto de personas desempleadas lo forman las mujeres. Las personas más pobres entre los pobres son mujeres y los marginados socialmente y excluidos son también mujeres». También recordó que mil trescientos millones de personas viven en la más absoluta pobreza, mil quinientos millones no tienen acceso a los servicios de salud más básicos, y el setenta por ciento de desfavorecidos del mundo son mujeres.

De modo que, la problemática no es sólo de nuestra provincia y de nuestro país. Ello, no significa que el sentirnos acompañados en nuestras aflicciones, acarree como lógica consecuencia un conformismo -bien mirado por el determinismo de la nueva derecha-, generando a la vez, un afilgente abstencionismo estatal.

Deviene entonces, deber insoslayable del Estado, velar por aquellos que menos tienen. De donde, la falta de políticas públicas, al propio tiempo que torna lacerante la vulnerabilidad del actor social, aumenta la vigencia de la discriminación tematizada, magüer los contenidos de la constitución formal.

MR32. La discriminación laboral del infectado chagásico. Sus características según género.
ELVIRA RISSECH. CONICET

Instituto Nacional de Parasitología "Dr. Mario Fatale Chaben" Av. Paseo Colón 568 (1063) Buenos Aires.

La ley 22.360/80 de Prevención y Lucha contra la enfermedad de Chagas establece la obligatoriedad de las reacciones serológicas en el examen prelaboral y señala que "la simple serología reactiva para la enfermedad de Chagas no podrá constituir elemento restrictivo para el ingreso al trabajo siempre que a la fecha del examen preocupacional no existan otros elementos diagnósticos, clínicos, radiológicos y electrocardiográficos que indiquen disminución de la capacidad laboral imputable a infección chagásica". Pese a ello, en muchos casos las personas con infección chagásica no ingresan a los trabajos a los que se postulan.

Esta investigación se llevó a cabo en el Instituto Nacional de Parasitología. Se entrevistaron 186 personas - 81 varones y 105 mujeres - entre 15 y 45 años. Estas personas realizan un seguimiento médico en el Instituto y estaban todos en fase indeterminada. Se utilizó un cuestionario con preguntas cerradas y abiertas.

Entre los entrevistados con experiencia laboral, el 24,7% de los varones y el 17,5% de las mujeres tuvo problemas en el examen prelaboral o en el mantenimiento de su trabajo. Entre los entrevistados que no tuvieron problema en forma directa el 27,1% de los varones sabía de la existencia de problemas para el ingreso laboral de los infectados chagásicos, el porcentaje de mujeres en esa situación era del 32,9.

Esta discriminación del trabajador infectado no es uniforme, parece ser más frecuente en algunas ramas que en otras. Hay en general un amplio margen de variabilidad en las conductas médicas y empresarias sobre el tema.

En muchos casos las personas ignoran que están infectadas, conocen esa situación en el examen prelaboral. En forma simultánea saben que "tienen Chagas" y que por ello no pueden trabajar. Trabajo y salud son dos áreas estratégicas en la vida de las personas, por ello el impacto sobre la persona de la exclusión del mercado laboral por una "supuesta enfermedad" que no afecta su organismo es fuente de angustia.

En el caso de las mujeres, la discriminación laboral tiene lugar en distintas actividades, pero es frecuente entre enfermeras y mucamas. En el caso de empleadas domésticas hay casos en que fueron echadas al conocer las empleadoras que "tenían Chagas", sin que mediara ninguna intervención médica.

En el caso de las mujeres se suma a la discriminación laboral la preocupación por la posibilidad de transmitir la infección a sus hijos.

Moléculas blanco para la acción de drogas parasiticidas

MR33. The trypanothione peroxidase activity of trypanosomatids is exerted by two distinct proteins working in concert. L. FLOHÉ¹, D. GOMMEL², M. KIES², M. MONTEMARTINI², E. NOGOCEKE², M. SINGH¹, P. STEINERT¹, H. KALISZ².

¹Department of Physiological Chemistry, Technical University of Braunschweig, Germany.
²GBF - National Research Centre for Biotechnology, Braunschweig, Germany

It is widely accepted that in parasitic trypanosomatids, glutathione-dependent hydroperoxide removal is replaced by an analogous system utilizing trypanothione as a reductant. The components critical for the host system, glutathione reductase and glutathione peroxidase, appear to be absent. Instead, a trypanothione reductase, which is homologous to glutathione reductase, has been found in various trypanosomatids (1) and characterized in depth (2). Also the biosynthetic pathway transforming glutathione into the (N¹,N⁸-bis(glutathionyl)spermidine) derivative trypanothione has been elucidated to some extent (3). However, an enzymatic entity catalyzing the reduction of hydroperoxides at the expense of trypanothione could never be isolated, although a corresponding activity appeared to be present in crude homogenates of *Trypanosoma*, *Leishmania* and *Crithidia* species.

We recently resolved this puzzling observation by demonstrating that in *Crithidia fasciculata* a trypanothione peroxidase indeed does not exist but that the hydroperoxide reduction by trypanothione is catalyzed by two distinct proteins; a small protein directly reacting with trypanothione and a high molecular weight oligomeric peroxidase which is reductively regulated by the former (4). The protein being reduced by trypanothione and reducing the peroxidase has a molecular mass of about 16 000 and, according to partial sequencing, is remotely related to thioredoxin. Its active site is characterized by the sequence motif WCPPC which again resembles of

the thioredoxin active site WCGPC. Due to its similarity to thioredoxin it has been named tryparedoxin (5). The partial reactions of tryparedoxin with its substrates, trypanothione and the peroxidase, occur independently as evidenced by ping-pong kinetics and derivatisation studies (6). The catalytic potential of tryparedoxin is characterized by limiting K_m values of 130 μ M and 2.2 μ M for trypanothione and the peroxidase, respectively, and a $V_{max}/[E]$ of 392 min^{-1} .

The second component of the system works as a tryparedoxin:hydroperoxide oxidoreductase or, in short, tryparedoxin peroxidase. It is composed of identical subunits of 21 000 and, in its native state has an apparent mass around 280 000. Sequencing of peptide fragments (4) and of the encoding DNA (7) revealed that tryparedoxin peroxidase is a member of the peroxiredoxin family of proteins. The peroxiredoxins, apart from an increasing member of proteins with ill-defined function (8) comprise several peroxidases, in particular thioredoxin peroxidases in yeast and mammals (9) and the alkylhydroperoxide reductases of bacteria (10). Aligning the sequence of tryparedoxin peroxidase with those peroxiredoxins with established peroxidase activity yields the consensus sequence $x_n P x_9 G x_3 V x_2 F x_1 P x_1 F x_1 F V C P x_2 S x_1 D x_7 W x_{14-17} D x_{15-16} G x_3 R x_2 F x_2 D x_{27} Q x_{4-8} V C P x_2 W x_n$. Clearly, the only functional residues enabling hydroperoxide reductions are the two conserved cysteine residues which have also been implicated in the catalysis of thioredoxin peroxidase (9). Kinetically, also tryparedoxin peroxidase is characterized by a ping-pong pattern, however, with unlimited K_m values and maximum velocities. The rate constant for the net forward reaction of the reduced peroxidase with H_2O_2 is $6 \times 10^3 \text{ mM}^{-1} \text{ min}^{-1}$ and thus in the same order of magnitude as the sulfur analogs of the selenoproteins, glutathione peroxidase (11) and phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (12). This implies that the active site cysteines of tryparedoxin peroxidase must be similarly activated as in the phylogenetically unrelated glutathione peroxidases. Interestingly, those residues forming the catalytic triad in glutathione peroxidases, i.e. glutamine and tryptophane (12), are also contained in the consensus sequence of the peroxiredoxin-type peroxidases. It may therefore be speculated that, by convergence, a similar active site has been generated in these otherwise unrelated types of peroxidases. The trypanothione peroxidase system detected in *C. fasciculata* is certainly unique and distinct from any known peroxidase system of bacteria, higher animals and plants. But circumstantial evidence suggests that it may be common to the whole family of *Trypanosomatidae*. A corresponding activity has been demonstrated in all genera of the family, all contain trypanothione and trypanothione regenerating systems, and recently a sequence closely related to tryparedoxin peroxidase of *C. fasciculata* was also detected in *Trypanosoma brucei rhodesiense* (13). The obvious restriction of this pathway to parasitic *Kinetoplastidae* promises a selective attack on a vital function of the parasite, once specific inhibitors of the system become available.

Supported by the Deutsche Forschungsgemeinschaft (Grant FI61/8-1).

References

- Hunter, W.N.; Bailey, S.; Habash, J.; Harrop, S.J.; Helliwell, J.R.; Aboagye-Kwarteng, T.; Smith, K.; Fairlamb, A.H. (1992) *J. Mol. Biol.* 227, 322-33
- Fairlamb, A.H., Cerami, A. (1992) *Annu. Rev. Microbiol.* 46, 695-729
- Koenig, K.; Menge, U.; Kieb, M.; Wray, V.; Flohé, L. (1997) *J. Biol. Chem.* 272, 11908 - 11915
- Nogoceke, E.; Gommel, D.U.; Kieb, M.; Kalisz, H.M.; Flohé, L. (1997) *Biol. Chem.* 378, 827-836
- Flohé, L.; Nogoceke, E.; Gommel, D.U.; Kieb, M.; Kalisz, H.M. (1997) In: Packer, L.; Davies, K.J.A.; Cadenas, E. (eds.): *Oxidants and Antioxidants in Biology*. Red Lion Resort, Santa Barbara California, p. 24
- Gommel, D.U.; Nogoceke, E.; Morr, M.; Kieb, M.; Kalisz, H.M. and Flohé, L. (1997) *Eur. J. Biochem.*, in press
- Montemartini, M.; Nogoceke, E.; Singh, M.; Steinert, P.; Flohé, L. and Kalisz, H.M. (1997) submitted
- Chae, H.Z.; Robison, K.; Poole, L.B.; Church, G.; Storz, G. and Rhee, S.G. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91, 7017-21
- Chae, H.Z.; Kim I.; Kim K. and Rhee, S.G. (1993) *J. Biol. Chem.* 268, 16815-21
- Tagataglia, L.A.; Storz, G.; Brodsky, M.H.; Lai, A.; Ames, B.N. (1990) *J. Biol. Chem.* 265, 10535-40
- Rocher, C.; Lalanne, J.L.; Chaudiere, J. (1992) *Eur. J. Biochem.* 205, 955-60
- Maiorino, M.; Aumann, K.-D.; Brigelius-Flohe, R.; Doria, D.; van den Heuvel, J.; McCarthy, J.; Roveri, A.; Ursini, F. and Flohe, L. (1995) *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* 376 651-60
- el-Sayed, N.M.; Alarcon, C.M.; Beck, J.C.; Sheffield, V.C. and Donelson, J.E. (1995) *Mol. Biochem. Parasitol.* 73 (1-2), 75-90

MR34. Biosíntesis de glicoproteínas en *Plasmodium falciparum*, un potencial blanco para la acción de nuevas drogas antimaláricas. KATZIN A.M.¹, KIMURA E.¹, PERES V.J.¹, UHRIG M.L.², COUTO A.S.²

¹Departamento de Parasitología. ICB-USP, Brasil; ²Departamento de Química Orgánica FCEyN UBA. Argentina.

El paludismo es la principal enfermedad parasitaria en el mundo afectando más de doscientos millones de personas y ocasionando la muerte de 2 millones por año. *Plasmodium falciparum* es una de las cuatro especies de plasmodios responsables por el paludismo humano, y en el Brasil 50% de los casos anuales corresponden a esta especie de plasmodio; mientras que, en la Argentina la mayoría de los casos son producidos por *Plasmodium vivax*. Una de las alternativas propuestas por las autoridades internacionales, para controlar esta enfermedad ha sido la obtención de vacunas y nuevos quimioterápicos entre otras medidas, para lo cual es importante profundizar los conocimientos bioquímicos de este parásito. Una de las áreas poco estudiadas ha sido

la glicobiología de los plasmodios. Hemos demostrado recientemente la presencia de glicoproteínas N-glicosídicas en los estadios intraeritrocíticos del *P. falciparum*, habiendo una mayor preponderancia de éstas en los estadios iniciales del ciclo (trofozoito joven y maduro) (Kimura, E.A.S., et al. J. Biol. Chem. 271: 14452, 1996). Dos glicoproteínas, una de >200 kDa purificada del trofozoito joven, y otra de 200 kDa purificada del trofozoito maduro están siendo estudiadas en lo que se refiere a la estructura del oligosacárido. En ambas fue demostrada la presencia de oligosacáridos $\text{Man}_3\text{GlcNac}_2$ y $\text{Man}_5\text{GlcNac}_2$, estudios para determinar la estructura de cada una de ellas están siendo desarrollados.

Las glicoproteínas N-ligadas están asociadas a la maduración de las formas intraeritrocíticas ya que en presencia de tunicamicina los parásitos no completan su ciclo y se detienen en el estadio trofozoito. Por esta causa la inhibición de esta vía de biosíntesis puede ser un potencial blanco para la acción de drogas antimaláricas. A partir de esta hipótesis están siendo evaluadas otras drogas que pueden inhibir los diferentes intermediarios de la vía de biosíntesis de glicoproteínas. Cultivos de *P. falciparum* sincrónicos en el estadio anillo fueron tratados con mevastatina, esta droga inhibe la enzima hidroximetilglutaril CoA reductasa, reduciendo los niveles de colesterol plasmático en pacientes; por otro lado *P. falciparum* no sintetiza colesterol incorporándolo del plasma del huésped. Los parásitos tratados con 120 mM de mevastatina no se diferencian a esquizontes, se detienen en el estadio trofozoito maduro y mueren después de 50 hs de tratamiento. Cuando los parásitos fueron marcados metabólicamente con D [U- ^{14}C]-glucosa, en varias glicoproteínas del tipo N-glicosídicas no fue detectado el oligosacárido. Varias de las glicoproteínas del tipo N-ligadas, inhibidas por mevastatina tienen un peso molecular semejante a las inhibidas por tunicamicina. La inhibición de la biosíntesis de glicoproteínas en los estadios intraeritrocíticos de *P. falciparum* tratados con mevastatina pueden ser debidos a la falta de formación de dolicol, intermediario en esta vía de biosíntesis. Para confirmar esta hipótesis, cultivos de *P. falciparum* sincrónicos en el estadio anillo fueron no tratados y tratados con mevastatina, marcados metabólicamente con [1- ^{14}C] acetato de Na, y analizados por HPLC (columna de fase reversa). En los trofozoitos jóvenes y maduros no tratados con mevastatina fue detectado un pico que corresponde a dolicol el cual está siendo caracterizado en relación a sus unidades de isoprenos. La inhibición de la síntesis de dolicol o la competición con éste por análogos como terpenos pueden ser blancos interesantes para la obtención de nuevas drogas antimaláricas, esta hipótesis está siendo estudiada por nuestro grupo de trabajo. Apoyo: FAPESP, CNPq (Brasil) CONICET (Argentina) y Fundación Antorchas (Proyecto binacional)

MR35. Efecto del nifurtimox y del benznidazol sobre el contenido de glutatión y tripanotión en las formas epimastigotas, tripomastigotas y amastigotas del *Trypanosoma cruzi*. ANTONIO MORELLO, YOLANDA REPETTO, LUCY COLOMA, ROWENA TÉLLEZ Y CARLOS GAULE.

Programa de farmacología molecular y clínica. Instituto de Ciencias Biomédicas. Universidad de Chile. Casilla 70086, Santiago 7 Chile. e-mail: amorello@machi.med.uchile.cl.

Aproximadamente 18 millones de personas sufren de la tripanosomiasis americana causada por varias cepas del protozoo *Trypanosoma cruzi*. Las drogas que se han usado para el tratamiento de la Enfermedad de Chagas son el nifurtimox y el benznidazol. Su mecanismo de acción es a través de la formación de radicales libres y metabolitos electrofílicos. En el *T. cruzi*, los tioles libres como el glutatión (GSH), la glutatiónil-espermidina (GSH-SP) y el tripanotión (T(SH)₂), juegan un papel importante en la defensa contra radicales libres en el parásito. Existen grandes diferencias en la resistencia al nifurtimox y benznidazol entre diferentes cepas del *T. cruzi*. El contenido de tioles reducidos en las diferentes formas del parásito fue determinado por derivatización con monobromobimano y posterior separación y cuantificación por HPLC. La concentración de tioles totales en epimastigotes y tripomastigotes del clon Brener, fueron de $1196,0 \pm 73,5$ y de $892,9 \pm 76,8$ nmol/g peso fresco, respectivamente. En la cepa LQ fueron de $977,0 \pm 90,7$ y $999,8 \pm 48,0$ nmol/g peso fresco respectivamente y en el clon Dm28c fueron de $612 \pm 89,5$ y $66,1 \pm 24,2$ nmol/g peso fresco respectivamente. El tiol más abundante fue el tripanotión (62 a 72%). En amastigotes de la cepa MF, los tioles totales fueron de $290,7 \pm 36,9$ nmol/g peso fresco; en tripomastigotes, de $427,9 \pm 69,1$ y en epimastigotes, de $889,8 \pm 62$ nmol/g peso fresco. El nifurtimox (20 mM) y el benznidazol (100 mM) produjeron una disminución de la concentración de tioles libres en más del 80%, siendo el tripanotión el más afectado (>90). Se concluye que la concentración de tioles libres varía de una cepa a otra y de una forma a otra en el *T. cruzi*, siendo el tripanotión, el tiol más abundante y el más afectado por las drogas tripanocidas nifurtimox y benznidazol. Además, la susceptibilidad al nifurtimox y al benznidazol está relacionada con el contenido de tioles libres. La disminución de los tioles reducidos en los parásitos tratados por 2 horas con las drogas no fue por oxidación de los mismos y más bien se debería a la conjugación con GSH y T(SH)₂ de metabolitos electrofílicos producidos por la nitrorreducción de las drogas.

La síntesis del glutatión y por consiguiente del tripanotión es un posible blanco quimioterapéutico en el desarrollo de drogas antichagásicas. Financiado por SIDA-Suecia y Fondecyt 1961095-Chile.

MR36. Knowledge assisted design of potentially active anti-trypanosomal compounds. M. PAULINO¹, F. IRIBARNE¹, M. HANSZ¹, M. VEGA¹, G. SEOANE², H. CERECETTO², R. DI MAIO², I. CARACELLI³, J. ZUKERMAN-SCHPECTOR³, C. OLEA⁴, A.O.M. STOPPANI⁵, M.A. BASOMBRIO⁶, A. H. FAIRLAMB⁷, O. TAPIA^{8*}.

¹Laboratorio de Química Cuántica, Facultad de Química, Universidad de la República. Gral. Flores 2124, 11800 Montevideo-Uruguay. ²Laborato-

rio de Química Orgánica, Facultad de Química, Universidad de la República. Gral. Flores 2124, 11800 Montevideo-Uruguay. ³Laboratorio de Cristalografía, Modelagem Molecular e Esteriodinâmica -Departamento de Química, Universidade Federal de São Carlos- SP- Brasil. ⁴Departamento de Química Inorgánica y Analítica, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile, Chile. ⁵Bioenergetics Centre, Universidad de Buenos Aires, Paraguay 2120, Buenos Aires, Argentina. ⁶Laboratorio de Patología Experimental, Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad Nacional de Salta, Argentina. ⁷Department of Biochemistry, Medical Sciences Institute, University of Dundee, Dundee DD1 4HN, Scotland, UK ⁸Department of Physical Chemistry, Uppsala University Box 532, S-751 21 Uppsala, Sweden.

A molecular design is presented of 5-nitrocompounds derivatives based on a knowledge about glutathione (GSSG), trypanothione (TS2) and glutathionylspermidine disulfide (GSP disulfide) in their complexes with the enzymes glutathione reductase (GR) and trypanothione reductase (TR). New trypanothione-like 5-nitrofuranic and 5-nitrothiophenic semicarbazide and acetamide compounds were designed using the theoretical lead compound: N1-[1-(5-nitro-2-furyl)methylidene]- N4 -(4 - [3 - (2,2,2 - trifluoroacetyl) hexahydro - 1 - pyrimidinyl]butyl) semicarbazide (NPIPICO). They are expected to act as transition state analogues. Eight compounds were synthesized in the pathway to get NPIPICO: 4-(2-methoxyethyl)-1-(5-nitrofurfuriliden) semicarbazide (GI03), 4-butyl-1-(5-nitrofurfuriliden) semicarbazide (RD06) and 4-hexyl-1-(5-nitrofurfuriliden) semicarbazide (GI01), the corresponding (5-nitrothiophene) semicarbazides (SG03, SG06 and SG01) and 2-methoxyphenyl-1-(5-nitrofurfuriliden) semicarbazide (HC05) and the corresponding 5-thionitrophenes (SH05). A docking of these compounds in the putative binding site of TR was performed in order to make a comparison of interactions in relation to a recent X-ray structure of TR(*T. cruzi*)-mepacrine complex by Krauth-Siegel and coworkers (PROTEINS 1996,24,73-80). Enzymologic studies proved that many of these compounds are inhibitors of TR. Furthermore, they were tested in vitro and in vivo showing *T. cruzi* growth inhibition.

MR37. O-naftoquinonas lipofílicas como agentes tripanocidas potenciales. ANDRÉS O.M. STOPPANI.

Centro de Investigaciones Bioenergéticas. Universidad de Buenos Aires. Paraguay 2120. Buenos Aires. Argentina

o-Naftoquinonas, como la β -lapachona, que fueran antes propuestas como agentes antichagásicos, han resultado potentes inhibidores del crecimiento de células tumorales humanas, lo que ha renovado el interés por esas quinonas. Por ello, se revisan ahora los mecanismos de la citotoxicidad de varias o-naftoquinonas

y moléculas similares, representadas por la β -lapachona y las mansononas. La mayoría de esas quinonas son potentes inhibidores del crecimiento de *Trypanosoma cruzi*, *Crithidia fasciculata* y *Leptomonas seymouri*, a concentraciones del orden de 1.0-10 μ M. Su acción implica la operación de reacciones redox, la inicial de reducción de la quinona a quinol (hidroquinona), es seguida por la oxidación del quinol por oxígeno molecular. La oxidación del quinol genera radicales semi-quinona, superóxido y peróxido de hidrógeno capaces de generar el radical hidroxilo, notable por su citotoxicidad. Como consecuencia de esas reacciones se produce un «daño oxidativo», que en los protozoarios estudiados se manifiesta por la disminución del ATP celular como resultado de la inhibición de la fosforilación oxidativa. también se produce disminución de la síntesis de DNA, RNA y proteínas celulares. Al mismo tiempo, las quinonas aumentan la degradación fisiológica de las mismas moléculas. Resultados similares se obtuvieron con naftoquinona-iminas. Los grupos carbonilos vecinos y el anillo pirano son estructuras esenciales para la acción citotóxica de las quinonas. Estos efectos se discuten en relación a posibles usos farmacológicos de las naftoquinonas lipofílicas.

Estrategias de intervención para el control de las parasitosis

MR38. Vacinas em Leishmanioses. CARLOS MAURICIO DE FIGUEIREDO ANTUNES.

Departamento de Parasitologia, Instituto de Ciências Biológicas. Universidade Federal de Minas Gerais, Brasil

As medidas tradicionais utilizadas para controle das leishmanioses não vem sendo capazes de conter a expansão desta endemia e um aumento nas taxas de incidência vem sendo observado em várias áreas endêmicas. No Brasil, de acordo com o Ministério da Saúde, mais de 150 mil casos de leishmaniose cutânea foram registrados nos últimos 10 anos, com uma incidência de mais de 20 mil casos novos por ano, nos últimos 5 anos.

Em vista destes fatos, a vacinação contra as leishmanioses vem sendo considerada como uma medida profilática aceitável, prática e segura. Atualmente, dois enfoques distintos podem ser identificados em relação ao desenvolvimento de vacinas anti-leishmanioses. O enfoque sistemático que inclui (a) estudos sobre identificação, purificação e produção de frações protéicas de várias espécies de *Leishmania* capazes de induzir proteção; (b) seleção de substâncias adjuvantes e (c) avaliação da resposta imune em modelos animais. O enfoque pragmático, que utiliza extratos brutos de várias espécies de *Leishmania* (ou organismos vivos) para indução da proteção. Estas preparações, embora padronizadas de diferentes maneiras, não são definidas. Deve ser ressaltado, entretanto, que a maioria das vacinas em ensaios clínicos, incluindo a Fase III (ensaios controlados a nível populacional), são de preparações brutas não definidas.

Três esquemas distintos de vacinação vem sendo utilizados nos ensaios à nível de campo, controlados ou não. A leishmanização, que envolve a inoculação de espécimens vivos de *Leishmania* em áreas não expostas do corpo, é um procedimento que vem sendo utilizado há bastante tempo no Velho Mundo, em áreas endêmicas para leishmaniose cutânea. Basea-se no fato de que a maioria das lesões cura espontaneamente e induz proteção. Relatos de falhas na cicatrização destas lesões tem sido publicados e este procedimento não é recomendado pela Organização Mundial da Saúde (OMS). O segundo esquema envolve a utilização de frações antigênicas de várias espécies de *Leishmania*. Grande parte dos estudos referem-se à experimentos em modelos animais, mas recentemente um ensaio clínico não controlado foi conduzido em área endêmica no Brasil, com resultados promissores. O terceiro esquema utiliza «vacinas» constituídas à partir de formas promastigotas mortas de várias cepas de *Leishmania*. Estes estudos iniciaram-se na década de 30 no Brasil e a partir desta data vários ensaios à nível de campo, controlados ou não, foram conduzidos em diferentes áreas endêmicas de diversos países no Novo (Brasil, Venezuela) e Velho Mundos (Irã). Os resultados tem mostrado um proteção parcial contra infecção por *Leishmania*, principalmente naqueles participantes que viram o teste cutâneo (de negativo para positivo) após vacinação. Praticamente não foram relatados efeitos adversos à vacinação, com excessão de dor no local da injeção.

Embora as preparações contendo frações antigênicas ou extratos brutos de *Leishmania sp.* tenham mostrado eficácia parcial, protegendo participantes «vacinados», várias críticas foram feitas quanto à sua composição e caracterização e, principalmente, quanto à real necessidade de serem utilizadas diferentes cepas nestes produtos. Atualmente, com o apoio da OMS, um preparado vacinal utilizando uma única cepa de *Leishmania amazonensis* vem sendo desenvolvido por uma indústria no Brasil, utilizando um protocolo GMP («good manufacturing practices»). Ensaios clínicos fase I e II com esta «vacina já foram realizados e os resultados indicam indução de imunidades humoral e celular.

MR39. La participación comunitaria en el control de Chagas. MARÍA LAURA ESQUIVEL¹, ADOLFO O. GÓMEZ², O. DANIEL SALOMÓN², SERGIO SOSA ESTANI² Y ELSA L. SEGURA².

¹ Johns Hopkins University, School of Hygiene and Public Health; ² CEDIE - ANLIS "Dr. Carlos G. Malbrán"

La estrategia de participación comunitaria es el mecanismo elegido por el Programa Nacional de Chagas con el objetivo de lograr un cambio planeado: la incorporación de comportamientos que previenen la transmisión de Chagas y la eliminación de otros que implican riesgo de infección. El objetivo final es la eliminación de la transmisión y la ausencia de nuevos casos humanos de Chagas, para lo cual es necesario eliminar el triatomismo domiciliario. Para poder analizar, y poste-

riormente evaluar, el impacto de esta estrategia, primero es necesario partir de un entendimiento homogéneo de estos conceptos, ya que no siempre se dice lo mismo cuando se habla de participación y de comunidad.

La definición más simple, intuitiva, y clásica de **comunidad** es aquella que la define como un grupo de personas que viven en la misma área geográfica y que comparten los mismos valores básicos, la misma organización y los mismos intereses (Rifkin et al, 1988). Una definición más amplia es la de entidad social informalmente organizada caracterizada por un sentido de identidad (White, 1982). Esto es así, ya que una comunidad no necesariamente implica la pertenencia a una unidad geográfica definida. Más recientemente, y de alguna manera incorporando las anteriores, una comunidad ha sido definida como una población que está definida geográficamente, pero que además existe como entidad social discreta, con identidad colectiva y un objetivo corporativo (Manderson et al, 1992). A los fines del Programa Nacional de Chagas, es necesario tener en cuenta la dimensión geográfica.

Participación comunitaria es el proceso social por el cual grupos específicos, que comparten las mismas necesidades y viven en un área geográfica definida, identifican sus necesidades, toman decisiones y establecen mecanismos para satisfacer esas necesidades (Rifkin, 1988). Este concepto de participación tiene distintos niveles que se relacionan con los distintas dimensiones y características de las actividades que se desarrollan (Rifkin, 1990) y con distintos enfoques de cambio y roles de los agentes de cambio en cada uno de ellos. Un primer nivel simplemente significa la aceptación por parte de la comunidad de actividades definidas como positivas y protectivas de la salud, participando solo pasivamente recibiendo los beneficios de las actividades. En un segundo nivel, la comunidad participa en las actividades del programa, contribuyendo por ejemplo con su fuerza de trabajo, tal es el caso de los mismos pobladores y los representantes comunitarios. Un tercer nivel implica participar en la implementación, asumiendo responsabilidades administrativas, tareas actualmente ejercidas por los representantes comunitarios y los supervisores. El cuarto nivel se relaciona con el monitoreo y evaluación del programa, tareas en las cuales participan todos los niveles de la cadena de responsabilidades establecida por el programa. El quinto y último, más acorde con un criterio participativo amplio y con las tesis presentadas por Briceño-León (1996), implica participar en la planificación, decidiendo cuáles programas deben ser implementados. Esto supone que los individuos son capaces de definir y solucionar sus problemas, y el agente de cambio se limita a facilitar ese proceso de auto-examen y compromiso con la acción, ayudando al acceso a fuentes de fondos y toma de decisiones. Este enfoque se relaciona con el desarrollo de mecanismos de autoayuda y desarrollo comunitario, compromiso y control del futuro de esa misma comunidad. La participación es activa, implica elección, y alternativas efectivas y reales.

Esta estrategia, si bien promete el mantenimiento de los programas a largo plazo, enfrenta obstáculos para su implementación. Por un lado, aún no existen expe-

riencias de programas participativos de alcance masivo ni de larga duración de los cuales extraer conclusiones definitivas. Por otro, es necesario tener en cuenta que, como señala Madan (1987), «las comunidades participativas se 'hacen', no 'nacen'».

MR40. Aplicación de la comunicación social en la vigilancia vectorial de la transmisión de la enfermedad de Chagas. GÓMEZ A¹, ESQUIVEL M.L.²

¹CEDIE-ANLIS "Dr. Carlos G. Malbrán"; ²Johns Hopkins University, School of Hygiene and Public Health.

El proyecto «Comunicación Social aplicada a la Vigilancia del Control de la Enfermedad de Chagas» tiene como objetivo investigar los mecanismos por los cuales la Comunicación en Salud puede facilitar y mejorar la participación de la comunidad en el control y vigilancia de una enfermedad transmitida por insectos, específicamente Chagas, con el objetivo final de lograr cambios de comportamiento en la población.

La Comunicación ha sido entendida como un proceso por el cual una fuente transmite un mensaje a través de un canal para producir un efecto en el receptor. Esta concepción lineal se ha ido transformando para dar paso a otra: Un proceso por el cual los individuos intercambian símbolos a través de diversos canales y acuerdan sus significados con el objeto de coincidir en un curso de acción común. Así, la Comunicación Social para la Salud ha evolucionado hasta comprender hoy un grupo complejo de principios y procedimientos multi y transdisciplinarios teóricos y operacionales: Es más que el uso de medios masivos de comunicación o la difusión de información relevante. La comunicación social implica el uso del proceso de comunicación para producir condiciones y/o comportamientos que creen, promuevan y mantengan la salud de la población.

Diversas investigaciones han demostrado que la simple información no es suficiente, sino que es esencial tener en cuenta los principios de análisis de los comportamientos. Este enfoque permite examinar la estrecha relación que existe entre los comportamientos relacionados con la salud y los que los preceden y continúan, incorporando las influencias culturales, normas sociales y compromiso de la comunidad para transformar esos comportamientos.

Existen diversas teorías y modelos de análisis de comportamientos con enfoques, micro y macro, que hacen hincapié en el individuo o el grupo social, y que se desprenden de Ópticas psicológicas, psicosociales, sociológicas, o antropológicas, entre las más difundidas.

Los comunicadores sociales concuerdan en que el proceso de comunicación debe alternar investigación y acción. El comunicador entra en diálogo con la comunidad a través de la investigación sistemática continua con representantes de la audiencia objetivo. Primero debe escuchar a la comunidad para desarrollar estrategias y actividades basadas en las necesidades, contexto cultural y prácticas de esa comunidad. Luego se ensayan estrategias y materiales antes de difundirlos masivamente

te y después de un tiempo, en base a las reacciones de los miembros de la comunidad, se cambian y ajustan si es necesario. Esta combinación de investigación y acción permite que la audiencia decida y asegura que las estrategias y los materiales respondan específicamente a sus necesidades.

Al investigar el uso de la comunicación social, con mensajes adecuados y bajo condiciones variadas de la realidad, nos proponemos la adopción - por parte de la Comunidad y en el seno de cada núcleo familiar - de dos conjuntos de comportamientos para una eficaz vigilancia vectorial: 1. El uso correcto de las herramientas útiles para la vigilancia entomológica, y 2. El orden de la vivienda.

Cada uno de estos conjuntos de comportamientos involucra varias conductas, habilidades, conocimientos y creencias, así como factores que facilitan o inhiben su aceptación, e implican un movimiento de información en ambas direcciones, entre el emisor de los mensajes y el receptor. Esta última implicancia es fundamental en el campo de la salud pública: La retroalimentación es esencial para la motivación de la población y es la manera más eficaz para prevenir que el receptor se convierta en un elemento pasivo evitando la participación activa en la prevención y control de las enfermedades.

MR41. Monitoreo de la presencia de insectos vectores. RICARDO E. GÜRTLER

Depto. biología, FCEN-UBA, Ciudad Universitaria, 1428 Buenos Aires.

La vigilancia es una fase crucial de los programas de control o eliminación de artrópodos vectores de patógenos. Los objetivos de la vigilancia son detectar las áreas o viviendas reinfestadas y realizar nuevas acciones de control en forma oportuna. Para estos fines, son de suma relevancia (1) la selección de métodos eficaces y eficientes para monitorear la aparición de la reinfestación, (2) la recolección y procesamiento de la información derivada del monitoreo, y (3) su correcta interpretación en el contexto en que se colectó, con vistas a aplicar nuevas acciones de control y evaluar su eficacia.

En el caso de la enfermedad de Chagas, la detección de triatominos en casas de barro y paja es una tarea dificultosa durante la vigilancia. Los métodos más utilizados incluyen (1) la búsqueda y captura de triatominos por personal especializado asistido con un aerosol desalojante durante cierto tiempo por casa (hora-hombre), (2) las capturas de vectores por los propios moradores durante períodos usualmente prolongados e indefinidos, y (3) el uso de refugios artificiales de cartón de variadas características (cajas de Gómez-Núñez y biosensores) u hojas de papel de escribir a máquina o calendarios fijados a las paredes de dormitorios durante largos períodos. En comunidades rurales santiagueñas rociadas en forma integral con deltametrina floable en 1992, implementamos un monitoreo simultáneo de la reinfestación por *Triatoma infestans*, *T. guasayana* y *T. sordida* con múltiples métodos que sigue hasta la actualidad y son motivo de

otras comunicaciones. Usando esta experiencia, en esta presentación reviso la interpretación de los diferentes signos de infestación, algunos de los índices derivados y sus implicancias para el control.

«Infestación» ha sido tradicionalmente definida como la presencia de algún estadio de los triatominos (huevos, ninfas o adultos vivos) o sus productos (cáscaras de huevos, exuvias o deyecciones) en domicilio o peridomicilio. Debido a que los distintos métodos de muestreo difieren en su eficiencia de detección y en los estadios o signos que habitualmente detectan, los índices de infestación que arrojan son poco comparables entre sí. El índice de infestación más comúnmente empleado -el porcentaje de casas infestadas- no es una medida adecuada de la intensidad de infestación de una comunidad porque no considera ni el número de los diferentes focos de cría del vector ni la abundancia individual de triatominos en ellos y por ende su productividad potencial. Estos focos de cría pueden ser múltiples por vivienda, y son importantes para describir el estado real de infestación y predecir su posible capacidad de expansión en ausencia de acciones de control. Soper (1967) realizó una crítica similar al índice de viviendas empleado en los programas de control del *Aedes aegypti*.

Aunque muchos autores consideran cualquier signo o número de signos como evidencia suficiente y equivalente de infestación, en la práctica no lo son. Soler (1969) introdujo «invasión» para describir el hallazgo de uno o pocos *T. infestans* adultos aislados que llegaron volando a la vivienda. «Colonización» ha sido definido como el hallazgo de ninfas en la estructura inspeccionada. Durante la vigilancia, el hallazgo de un triatomo adulto aislado en la vivienda o sus anexos muy probablemente indica una invasión reciente y no una colonización. En nuestro estudio, hallazgos aislados de 1-2 adultos de *T. infestans* o *T. guasayana* en los dormitorios por algún método o 1-2 deyecciones en los biosensores durante 2 años no se correlacionaron con el desarrollo progresivo de colonias domiciliarias, en ausencia de rociados domiciliarios adicionales. Estos datos sugieren que la participación de la comunidad como agentes permanentes de detección y remoción de triatominos permitió casi anular la tasa de recolonización domiciliar de *T. infestans*, en comparación a observaciones previas en esta y otras áreas.

MR42. Randomization and baseline transmission in vaccine trials. CLAUDIO J. STRUCHINER* AND M. ELIZABETH HALLORAN*.

*IMS/UERJ and Escola Nacional de Saúde Pública Fundação Oswaldo Cruz Rio de Janeiro, RJ 21041, Brazil e-mail: stru@malaria.procc.fiocruz.br
*Department of Biostatistics Rollins School of Public Health Emory University. 1518 Clifton Road NE, Atlanta, Georgia 30322 USA Phone: (404) 727-7647 FAX: (404) 727-1370 e-mail: betz@bear.sph.emory.edu

In randomized trials, the treatment assignment mechanism is independent of the outcome of interest and other covariates, observed or not, thought to be relevant in determining this outcome. It also allows, on

average, for a balanced distribution of these covariates in the vaccine and placebo groups. Thus, the treatment groups are seen as comparable. Baseline transmission, pre-existing immunity and individual responsiveness are examples of possibly relevant factors that may be observed or not. As long as the assignment mechanism is independent of the outcomes, and only depends on observed covariates, any dependence of the assignment mechanism on the relevant covariates can be taken into account in the analysis. For these reasons, randomization, in addition to double-blindness are usually seen as good research practices in order to conduct valid clinical trials.

Randomization, however, does not guarantee that the estimated effect is an unbiased estimate of the biologic effect of interest. The ability of randomization to control for confounding has been challenged from at least two different perspectives. From the perspective of potential outcomes, effect measures can be confounded even if the treatment assignment mechanism is random. On the other hand, upon examination of the effects of omitting a covariate that has the same distribution among exposed and unexposed subjects from regression analyses of cohort data, it can be shown that the situations are fairly limited in which a balanced covariate can be omitted without biasing the estimates.

These results hold as well in Phase III randomized vaccine efficacy field trials, though a new dimension is added when the covariate being considered is the natural challenge to infection, such as an infectious mosquito bite or a sexual contact. This covariate is often not recorded in field trials and is assigned by nature to the study participants. Although the efficacy estimate can be based on parameters such as the transmission probability that condition on exposure to infection, most vaccine studies do not collect information on the number of infectious challenges and are based on unconditional parameters such as incidence density, hazard rates, or incidence proportion. Measures of vaccine efficacy expressed as functions of the incidence proportion or hazard rates depend on the level of transmission.

In this presentation we focus on the role and limits of randomization in studies based on unconditional estimators of vaccine efficacy that do not explicitly take into account the number of exposures to infection that each person has. Based on a simple model of the biologic efficacy of interest, we extend the arguments on comparability and collapsibility to examine the limits of randomization to control for unmeasured covariates in vaccine field studies. Heterogeneity in prevaccination susceptibility and heterogeneous, but balanced, post-randomization exposure to infection can result in confounding even if the biologic response to the vaccine is homogeneous in the population. If the effect of the vaccine is heterogeneous among subpopulations, then there is more than one parameter of interest to estimate. Randomization does not guarantee easily interpretable estimates of vaccine efficacy within trials or exchangeability across sites. A series of examples illustrates the extent of the bias possible under a number of plausible biologic assumptions. Estimates from randomized, placebo controlled Phase III field trials that

differ in baseline transmission are not comparable unless baseline transmission is taken into account.

MR43. Proyecto Evaluación del Programa Nacional para el Control y Vigilancia de la Transmisión de Chagas con Participación Comunitaria. DANIEL SALOMÓN, ADOLFO GÓMEZ, MARÍA LAURA ESQUIVEL, SERGIO SOSA ESTANI, ELSA L. SEGURA.

ANLIS "Dr. Carlos G. Malbrán"- CEDIE

La evaluación de un Proyecto o Programa implica la comparación de los objetivos propuestos con los logros, y el análisis de como éstos fueron obtenidos. Su fin es servir como herramienta para la toma de decisiones y la propuesta de mejoras, mediante el balance esfuerzo - beneficio y la identificación de éxitos y fallas, retroalimentando así las estrategias operativas. Las metodologías de evaluación se basan en la colección de indicadores apropiados con procedimientos estandarizados para determinar, entre otras, cualidades la efectividad, eficiencia, impacto y perdurabilidad de procedimientos y estrategias. Por lo tanto la evaluación no debe confundirse con procedimientos de control como la supervisión (desempeño personal), el monitoreo de procedimientos, calidad y servicios, ni con la auditoría financiera.

El «Programa Nacional para el Control y Vigilancia de la transmisión de Chagas con participación Comunitaria utilizando tecnología Apropiada» (PNCH), contempla efectores en diversos niveles, numerosas entradas, salidas y variables, así los indicadores posibles son virtualmente infinitos. Tómese en cuenta solamente las últimas etapas efectoras supervisores-líderes comunitarios/agentes de salud-comunidad y tendremos una compleja gama de herramientas, procedimientos de transferencia, prácticas y comportamientos que pueden afectar el resultado final. En estos casos una estrategia analítica utilizada con éxito ha sido la identificación de categorías operativas o subsistemas y la evaluación de los mismos separadamente, por medio de observaciones y entrevistas, para identificar las fallas y medidas correctivas más apropiadas. Para evaluar el PNCH se adaptó la metodología conocida como «Análisis de Situación». Esta presupone que tanto la calidad del producto como el funcionamiento de cada subsistema o categoría está representado por variables correlativas de que pueden ser medidas mediante indicadores clave.

Evaluación del PNCH

1. Estrategia: evaluación en cascada de 4 niveles: a) Evaluación Interna (supervisión); b) Evaluación Externa (cruzada entre servicios); c) Evaluación Nacional; d) Evaluación Internacional

2. Herramientas: a) Planilla (nivel a-c); b) Encuesta Poblador (c); c) Encuesta Líder (c), d) metodología de análisis de planilla y procedimientos corrección.

3. Indicadores: a) Operativos ; b) Recursos humanos; c) Impacto; d) Costos

El proyecto de investigación de evaluación se está llevando a cabo en comunidades de Andalgalá

(Catamarca), Pellegrini y Termas de Río Hondo (Santiago del Estero). Las herramientas para realizar las evaluaciones hasta el nivel Nacional fueron ensayadas y validadas durante las primeras etapas del proyecto, y ya se han transferido a las unidades efectoras nacionales y provinciales.

Los resultados parciales en los sitios ensayados ha mostrado que la transferencia al líder/poblador del armado del biosensor detector de vinchucas (BDV) ha sido más eficaz que las indicaciones sobre los sitios Óptimos donde colocarlo o su importancia. Los BDV son revisados directamente por el poblador en 68.8%, permaneciendo sólo el 18.8% de los BDV sin revisar. Los BDV han mostrado tasas de infestación iguales o superiores a las obtenidas por la Hora/Hombre, de esta manera la habilidad y el incentivo para la detección de triatominos por la comunidad ha sido reforzada y estimulada generando un alto porcentaje de denuncias. Sin embargo estos niveles de infestación resultaron altos en el primer año en Gramilla (45%) y Pellegrini (16%), mientras Río Hondo y Andalgalá registraron tasas por debajo del 5%. Esto demostraría inconvenientes en las prácticas, logística, transferencia o conocimientos relativos a los procedimientos que siguen a la detección de la vinchuca en las primeras localidades y en sus entornos específicos. El análisis de las encuestas permitirá definir con mayor precisión cuál es el/los pasos críticos para proponer las medidas correctivas apropiadas.

Variación intraespecífica del *T. cruzi*. Correlación con función y epidemiología

MR44. Variación intraespecífica de *Trypanosoma cruzi* e inmunopatología. S GONZALEZ-CAPPA, V TEKIEL, A CELENTANO, G MIRKIN.

Depto. Microbiología, Parasitología e Inmunología, Facultad de Medicina, UBA, Paraguay 2155, (1121) Buenos Aires.

La existencia de diferentes formas clínicas de enfermedad de Chagas, así como la variación intraespecífica del *T. cruzi* (tropismo, virulencia, inmunogenicidad, etc.) son conocidas. Sin embargo, no se ha establecido un marcador que relacione alguna de las características descriptas con patología. En nuestro laboratorio intentamos determinar la capacidad y los mecanismos para producir daño de cepas de *T. cruzi* con comportamiento biológico opuesto. Para ello seleccionamos la cepa RA, letal para el ratón, reticulotrópica, inductora de opsoninas y lisinas activas contra la forma circulante del parásito, y la cepa CA-I (o su clon K98) no letal, mitotrópica y mala inductora de CA líticos y opsonizantes (Celentano & González Cappa, 1992; Celentano, 1996). En el periodo agudo, la infección con RA produce una falla en la funcionalidad macrofágica evidenciada por la menor capacidad microbicida de estas células sobre *Salmonella typhimurium* (Celentano & González Cappa, 1993). En este mismo periodo, ambas poblaciones de *T. cruzi* inducen depresión inmunológica con inhibición de la proliferación linfocitaria frente a mitógenos (Petray

1996); la infección con RA induce la mayor depresión. A pesar de esto existe activación macrofágica con mayor liberación de metabolitos del O_2 (Celentano & González Cappa, 1992) y NO (Petray 1996). En el período crónico la activación macrofágica de los sobrevivientes a la infección con RA es marcadamente mayor que la de los ratones CA-I/K98. Los parásitos circulantes de la cepa mitotrópica versus RA se interiorizan escasamente en fagocitos y su duplicación es más lenta. Estas diferencias podrían determinar distinta presentación antigénica y ser responsables de diferencias en inducción de respuesta inmune. Como el daño de esta enfermedad es mediado por mecanismos inmunológicos las diferencias encontradas entre ambas poblaciones de parásitos podrían reflejarse en la patología y en el mecanismo inductor/efector. Para analizarlo empleamos un modelo murino de daño de sistema nervioso periférico. Si bien ambas poblaciones parasitarias alteraron la neurotransmisión, los ratones CA-I/K98 presentaron EMG con signos de daño miopático y los ratones RA con signos neuropáticos. La inflamación fue más intensa en tejido nervioso de ratones RA y sólo en ellos se encontraron parásitos a este nivel. El fenotipo de los infiltrados tisulares mostró predominio sistemático de CD8+ en sistema nervioso en ratones RA, mientras que para CA-I/K98 este fenotipo sólo predominó a los 9 meses pi. En músculo esquelético los ratones RA presentaron células NK mientras que en los CA-I/K98 se hallaron linfocitos B- IgM y en intersticio depósitos de IgG. La respuesta proliferativa frente a Ag del huésped de CD4 y CD8 obtenidos de ratones RA, fue intensa con nervio y negativa con músculo; por el contrario, los linfocitos CA-I/K98 proliferaron con valores bajos frente a ambos Ag. La transferencia pasiva de células, tanto CD4 como CD8, de ratones RA crónicos a receptores normales, produjo daño sólo en sistema nervioso. En el caso de donantes CA-I/K98, sólo los CD4 transfirieron daño y el blanco fue músculo esquelético. Al analizar la reactividad de sueros anti-RA y anti-CA-I/K98 frente a Ag del huésped, la mayoría reconoció sistema nervioso por western blot pero sólo los anti-CA-I crónicos reconocieron músculo. En cambio, ambos antisueros reconocieron músculo y nervio por IFI. La autorreactividad no fue absorbida por Ag parasitarios. La inoculación intranervio de sueros que reconocen este tejido por IFI alteró la conducción nerviosa. Estos resultados sugieren que los auto-Ac no son cepa de parásito dependientes y que no se generarían por mimetismo molecular aunque podrían tener algún papel en la producción de daño mientras que los linfocitos T inducen ciertamente daño mediado por mecanismos dependientes de la población parasitaria.

MR45. Caracterización de poblaciones de *T. cruzi*. Posible importancia médica. ENRIQUE E. MONTAMAT.

Cátedra de Química Biológica. Facultad de Ciencias Médicas. Universidad Nacional de Córdoba.

El análisis de los zimogramas electroforéticos de extractos de *Trypanosoma cruzi* aislados de diferentes

huéspedes en la Argentina, permitió su caracterización en 12 zimodemos o «cepas isoenzimáticas» (Z). Considerando al *T. cruzi* como un organismo diploide y aplicando criterios empleados en genética de poblaciones, se pudo dar expresión cuantitativa a la variabilidad observada. Los resultados obtenidos, apoyan el origen clonal de las poblaciones del parásito. De los 12 zimodemos, 6 fueron aislados de humanos. De ellos sólo 2 (Z1 y Z12) son realmente frecuentes y de amplia distribución en el área endémica. La incidencia de lesiones cardíacas fue significativamente mayor en pacientes infectados con Z12 (72%) que en los que tenían Z1 (18%).

Obtener los zimogramas electroforéticos requiere la previa adaptación a cultivo del parásito, lo que demanda mucho tiempo y hace al procedimiento laborioso, dificultando su aplicación en clínica. Dada la correspondencia entre los agrupamientos de parásitos obtenidos por zimodemos, esquizodemos y sondas de DNA quinotoplástico (kDNA), es posible la identificación de zimodemos por estudios de kDNA. Una sonda de 270 pb purificada de la región hipervariable (HVRm) de minicírculos de kDNA de aislamientos Z1 y Z12 tomados como referencia, hibridizan específicamente con HVRm amplificado por PCR de aislamientos de *T. cruzi* de Z1 y Z12 respectivamente.

La identificación de los zimodemos de los parásitos infectantes en muestras de sangre de los pacientes chagásicos en fase inicial o intermedia de la enfermedad, puede ser de utilidad, no solo para el diagnóstico, sino también para la prognosis del curso más probable que pueda seguir la infección.

MR46. Expresión de la heterogeneidad del *Trypanosoma cruzi* in vivo. MIRIAM POSTAN.

Instituto Nacional de Parasitología "Dr. Mario Fatale Chaben", Buenos Aires.

La heterogeneidad del *T. cruzi* ha sido ampliamente demostrada por varios autores. En la infección experimental de animales de laboratorio con *T. cruzi*, dicha heterogeneidad se manifiesta mediante diferencias en los resultados obtenidos con diferentes aislamientos del parásito en una misma especie hospedadora, así como también en la variabilidad de resultados obtenidos en diferentes experimentos y laboratorios, utilizando un mismo sistema huésped-parásito. En relación a la variabilidad de resultados producidos por un mismo sistema experimental, Lambrecht ha postulado en 1965, que las poblaciones de *T. cruzi* obtenidas de fuentes naturales estarían constituidas por subpoblaciones parasitarias con potencialidades diferentes, y que las características biológicas de los aislamientos dependerían de las proporciones de las subpoblaciones presentes en el inóculo.

En nuestro laboratorio hemos estudiado varios parámetros de la infección aguda y crónica de ratones endocriados y modificados genéticamente y de ratas con cepas y clones de *T. cruzi* y establecido diferentes patrones de presentación de la infección específicos para cada sistema huésped-parásito. Esta diversidad de pre-

sentación de la infección por *T. cruzi* no solo ocurre entre poblaciones provenientes de diferentes fuentes sino también entre subpoblaciones de *T. cruzi* obtenidas de una misma fuente natural. La susceptibilidad de los animales a la infección, expresada por la mayor o menor mortalidad, tiempo de sobrevida y los niveles de parasitemia, dependen tanto de la base genética del animal como del parásito utilizados, mientras que la localización tisular de los parásitos y de las lesiones inflamatorias son características del aislamiento del *T. cruzi* utilizado, constantes para todos los huéspedes. Por ejemplo, los niveles de parasitemia inducidos por las cepas de *T. cruzi* Brazil o Y son más altos y persistentes que los inducidos por cualquiera de los clones evaluados, pero a su vez existen diferencias en la parasitemias inducidas por un mismo aislamiento parasitario (cepa o clon) en diferentes huéspedes. Respecto del parasitismo tisular, aunque éste es característico para cada aislamiento de *T. cruzi*, varía también de acuerdo a la etapa de la infección en que es evaluado. Por ejemplo, las cepas Y y Brazil son conocidas por invadir preferentemente macrófagos y células musculares cardíacas y esqueléticas respectivamente. Sin embargo, y al igual que con los clones Sylvio-X10, es posible detectar nidos parasitarios en varios tipos celulares y órganos durante la etapa aguda de la infección con estas cepas, mientras que los nidos parasitarios son detectados más frecuentemente en células musculares esqueléticas durante la etapa crónica de la infección con las cepas Y y Brazil, y en células musculares cardíacas con los clones Sylvio-X10. Por otro lado, hay otros aislamientos de *T. cruzi* como algunos de los clones Miranda, en que se detectan nidos parasitarios casi exclusivamente en células musculares lisas y esqueléticas, independientemente del momento de la infección. Finalmente, existen aislamientos de *T. cruzi* que raramente inducen parasitemias y parasitismo celular detectables con métodos rutinarios, y cuya infectividad es posible ser evaluada solo mediante métodos serológicos. Con respecto a las lesiones inflamatorias, éstas acompañan al parasitismo tisular y son también características de los aislamientos parasitarios, manifestándose cualitativamente en forma similar en los distintos animales, aunque existen variaciones cuantitativas de acuerdo a la susceptibilidad natural y estado de integridad del sistema inmune de los animales. Por último, es necesario destacar las diferencias del comportamiento de los clones de *T. cruzi* derivados de

una misma fuente, entre sí y respecto del aislamiento original.

MR47. Caracterización genética y biológica de poblaciones de *Trypanosoma cruzi* existentes en los vectores de Chile. ALDO SOLARI.

Departamento de Bioquímica. Facultad de Medicina. Universidad de Chile

Siete distintos genotipos de *Trypanosoma cruzi* se pueden distinguir con una muestra de 53 poblaciones aisladas de 5 regiones geográficas de Chile, analizadas por la técnica de electroforesis de campo pulsado y Southern análisis con sondas de DNA que codifican para el antígeno 13 y cruzipaina. Cuatro genotipos se encuentran en *Triatoma spinolai*, que representa el vector selvático y exclusivo de la Zona Central del este país. Por el contrario, seis genotipos se encontraron en *Triatoma infestans* de las 5 regiones geográficas y endémicas del país. Dos genotipos comunes se encontraron en ambos vectores, lo cual indica que no existe una estricta adaptación entre genotipo de parásito y huésped invertebrado como se postulaba.

Resulta interesante que *T. infestans* de las regiones endémicas del extremo Norte (Iª y IIª regiones), transmita distintos genotipos de *T. cruzi* que en las zonas centrales del país (IIIª, Vª y Región Metropolitana). Esto parecería ser reflejo de las barreras geográficas existentes en el país, como es el desierto de Atacama, así como por el hecho que *T. spinolai* solo se encuentra en las regiones centrales del país.

19 poblaciones de *T. cruzi* pertenecientes a los distintos genotipos detectados se estudiaron en un modelo experimental murino. Los resultados de mortalidad y virulencia no permitieron asociar a algún genotipo específico con alguna característica biológica particular. Sin embargo, las hembras comparadas a los machos demostraron ser más resistentes a la enfermedad de Chagas con todas las poblaciones de *T. cruzi* probadas.

En conclusión de este análisis epidemiológico molecular, es posible detectar dos áreas endémicas diferentes en las zonas Norte y Central de Chile, con diferentes genotipos circulantes de *T. cruzi*. La posible asociación entre genotipo de *T. cruzi* y manifestaciones clínicas de la enfermedad en humanos en ambas áreas geográficas se discute. Financiamiento: SAREC-CONICYT