

CONFERENCIAS: CO

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

*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-1/72 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-1/72 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 has 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 un 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 hibridado 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.dbm.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 difluoromethylornithine 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 peroxidoredoxins, 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 periportal 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 deleciones 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^a.

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 descritos 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, FAOZI 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 paleescens* 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, Rio 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 triatomínicos 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 triatomínicos 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: fncsrmg@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 económica de vastas zonas do país..., tudo indicando a urgência de medidas sanitárias capazes de atenuar a acção maléfica do Conorrinhus 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 Dias, 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, llegándose 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 a-ciano sustitución), 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 triatomino-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 infestadas 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 triatomínica 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 & Dias, 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 peridomiciliario, 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. Trata-se generalmente de la invasión doméstica por triatominos silváticos 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 más 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. Monografía. 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.
 - Días E, 1958. Profilaxia da doença de Chagas. O Hospital, 51: 285-298.
 - Días 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.
 - Días JCP, 1997. Controle da doença de Chagas. In Clínica e Terapêutica da Doença de Chagas. Días JCP & Coura JR (orgs), Rio de Janeiro. Editora Fiocruz, p. 453-468.
 - Schofield CJ & Días 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 vectorial 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