

1994). En el presente trabajo se describe el efecto del tratamiento antiparasitario sobre la incidencia de títulos elevados de AAG en muestras obtenidas entre 6 y 17 años después del tratamiento. Se estudiaron 43 pacientes de los cuales 21 recibieron tratamiento con Benznidazol o Nifurtimox, 10 en la infancia y 11 cuando adultos. El valor de los AAG se determinó por ELISA y se expresó como la relación entre la DO de los sueros de los pacientes y la DO promedio de 15 sueros normales de donadores de banco de sangre, estableciéndose en 0.800 el valor positivo sobre la base de una curva ROC. Los resultados de la incidencia de  $AAG \geq 0.800$  en los diferentes grupos fue la siguiente: Adultos tratados (n=15): 53.33%, Adultos no tratados (n=7): 47.14%, niños no tratados (n=11): 45.45%, niños tratados (n=10): 20% ( $p < 0.05$  respecto a los tres restantes grupos). Estos resultados indican que el tratamiento con drogas tripanocidas en la infancia disminuye a largo plazo la incidencia de títulos elevados de AAG, fenómeno que no ocurre cuando el tratamiento se realiza en la edad adulta, y sugieren que los títulos elevados de AAG podrían estar vinculados con la persistencia de infección y de lesión cardíaca.

**PG14. Núcleos en oruga (caterpillar) y grado de ploidía de los miocitos cardíacos en la miocarditis murina chagásica experimental.** H GARCIA RIVELLO, P CABEZA MECKERT, R LAGUENS.

CIC Pcia. de Buenos Aires e ICYCC, Fundación Favalaro, Belgrano 1746, Buenos Aires.

Los núcleos en oruga (Caterpillar) representan una distribución especial de la cromatina como gránulos o acúmulos condensados en un filamento único ubicado a lo largo del eje mayor del núcleo. Esta morfología se observa tanto en miocitos como en células intersticiales de corazones fetales y neonatales, en tanto que esta ausente en corazones adultos, razón por la que se cree que está vinculada con la replicación nuclear. La miocarditis de ratones adultos causada por la infección con *T. cruzi* presenta numerosos miocitos con núcleos en oruga ubicados en la vecindad de las lesiones inflamatorias, representando un modelo útil para estudiar el significado de esta variación de la morfología nuclear. En la presente comunicación se describe el grado de ploidía de los núcleos en oruga en corazones murinos con miocarditis chagásica. En ratones BALB/c infectados tres meses antes con la cepa CA1 de *T. cruzi* se estudió el grado de ploidía de los miocitos cardíacos en cortes histológicos coloreados con el método de Feulgen por medio de densitometría con un analizador de imágenes. En ratones controles no infectados (n=5) la mayoría de los miocitos eran 2c ( $80.71 \pm 4.8DS\%$ ) con una pequeña proporción de 4c ( $14.67 \pm 5.6DS$ ) y 8c ( $6.06 \pm 11.72DS$ ). En las áreas libres de inflamación del ventrículo izquierdo de los ratones chagásicos (n=6) se observó un aumento significativo de la proporción de miocitos 4c ( $23.36 \pm 2.7DS$ ) y 8c ( $13 \pm 7.6DS$ ). El análisis individual de los núcleos

en oruga mostró que todos eran 4c ( $45.32 \pm 30.14DS$ ) u 8c ( $45.32 \pm 30.96DS$ ). Estos resultados indican que en la miocarditis chagásica crónica experimental existe un aumento de la ploidía miocítica y que los núcleos en oruga son siempre poliploides, lo que sugiere que esta modificación está vinculada con un aumento del ADN nuclear y con la replicación celular y que la miocarditis induce remodelación miocítica.

**Protozoos: PR**

**PR1. Comparación de fracciones proteicas de medios de cultivos líquidos con y sin *Trichomonas vaginalis*.** R COSTAMAGNA, G NIIZAWA, G BALOGH.

Cátedra de Parasitología Clínica. Universidad Nacional del Sur. San Juan 670. (8000) Bahía Blanca.

Teniendo en cuenta que la *Trichomonas vaginalis* (Donné, 1837) no logra mantenerse viable durante mucho tiempo en los medios de cultivo líquidos, y que necesita nutrientes muy seleccionados ya que ella no es capaz de sintetizar la totalidad de las proteínas necesarias para sobrevivir, es que se procedió a comparar la composición proteica de cultivos líquidos con y sin *T. vaginalis*. Exudados vaginales, de mujeres entre 15 y 40 años con Trichomonosis activa, fueron inoculados en medio de cultivo Diamond (Menarini. cod. Tric 20. Ref. 1038. Barcelona-España). Se seleccionan seis cultivos positivos. Además, dos cultivos positivos para *T. vaginalis* que presentaban también desarrollo de elementos levaduriformes y un tubo de medio de cultivo sin exudado vaginal. Todos los cultivos son incubados 72 horas a 37 grados centígrados. Luego todas las muestras fueron concentradas por centrifugación. Se preparan tres lotes de muestras: uno con *T. vaginalis*, otro con este flagelado más elementos levaduriformes y un tercero con medio de cultivo solo. Se procede luego a la sonicación y dosaje de su contenido proteico por método de Lowry. Luego se efectúa corrida electroforética en gel de poliacrilamida (PAGE). Del análisis de los resultados pudo observarse que en las bandas correspondientes a las muestras con *T. vaginalis* las proteínas de P.M. entre 14-60 kDa habían disminuido prácticamente un 100% respecto de los testigos (medio de cultivo solamente); estas proteínas podrían haber sido consumidas por el parásito, lo que explicaría el decaimiento de la curva de crecimiento a las 48-72 hs. en medios de cultivo, por lo cual sería recomendable suplementar el medio aumentando la concentración de estas proteínas. También se observó que en estos cultivos positivos aparecían proteínas de P.M. aproximado entre 55-58 kDa, y donde había desarrollo de elementos levaduriformes también aparecían bandas correspondientes a 63 kDa; en ambos casos podrían ser propias o metabolitos excretados por el flagelado en el primer caso o por las levaduras en el segundo.

**PR2. *Trypanosoma cruzi*: activación de la proteína quinasa C en epimastigotes estimulados con factores metacíclicos.** MJ WAINSELBAUM<sup>1</sup>, EM LAMMEL<sup>1</sup>, MT TÉLLEZ-INÓN<sup>2</sup>, ELD ISOLA<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Dpto de Microbiología Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires, Paraguay 2155, 1121 Buenos Aires. <sup>2</sup> Instituto de Investigaciones en Ingeniería Genética y Biología Molecular (INGEBI), Obligado 2490, 1428 Buenos Aires.

Estudios preliminares mostraron que el homogenato de intestino de *Triatoma infestans* (HI) y un péptido aislado a partir del mismo estimulan la diferenciación epimastigote-metacíclico (epi-mtc). La adición de dos inhibidores de proteínas kinasas: Staurosporina y H7, produjo una inhibición parcial de la metaciclogénesis y el tratamiento de los epi con phorbol y diacil glicerol más fosfatidil serina, activadores de la proteína quinasa C (PKC), indujo la morfogénesis. Estos resultados sugieren una relación entre activación de PKC y diferenciación. El objetivo de este trabajo fue confirmar la activación de la PKC de los parásitos por un péptido de 19 aminoácidos (P19), derivado de la  $\alpha^D$  globina de gallina la cual está presente en el HI. Para ello, epi (cepa RA) previamente estimulados con el P19 (10  $\mu$ M, 15 min) y epi no estimulados (basal) fueron sometidos a ruptura obteniéndose finalmente en cada caso una fracción citosólica y otra de membrana, las cuales se sembraron en una columna de DEAE-celulosa (Gómez et al., 1989. Mol. Biochem. Parasitol., 36:101-108). En las muestras obtenidas por elución con NaCl (0,15 M) se midió la actividad específica de PKC ( $Ae/ml^1/mg^{-1}$ ) utilizando un sustrato específico derivado de la neurogranina. Los resultados mostraron en epi estimulados un aumento de la actividad específica de la enzima de 27.6 veces en la fracción citosólica y de 14.5 veces en la fracción de membrana respecto a los valores basales. Por otra parte, se evaluó la actividad biológica de los inhibidores selectivos de PKC Bisindolil maleimida (15 mM) y H7 (6  $\mu$ M)+HA 1004 (10  $\mu$ M), observándose una inhibición de la metaciclogénesis de 40% y 80% respectivamente. Estos resultados confirman la activación de la PKC en el proceso de morfogénesis y sugieren que un péptido derivado del HI interviendría en las vías de activación de dicha enzima. Este proyecto fue realizado con fondos de UBA y UNDP/WORLD BANK/WHO-TDR.

**PR3. Purificación y caracterización del oligosacárido presente en un antígeno urinario de *Trypanosoma cruzi*.** GM BERTOT<sup>1</sup>, AS COUTO<sup>2</sup>, RM DE LEDERKREMER<sup>2</sup>, S GRINSTEIN<sup>1</sup>, RS CORRAL<sup>1</sup>.

<sup>1</sup> Laboratorio de Virología, Hospital de Niños R. Gutiérrez, Gallo 1330, (1425) Buenos Aires y <sup>2</sup> Depto. de Química Orgánica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, Ciudad Universitaria, Pabellón 2, (1428) Buenos Aires.

Se ha identificado un antígeno urinario de *Trypanosoma cruzi* de 80 kilodaltons (Uag) eliminado durante la fase aguda de la infección, de naturaleza glicoproteica y relacionado estructural y funcionalmente con transferrina. Con el propósito de estudiar la fracción glicosídica del Uag, el antígeno fue digerido con N-glicosidasa F o endoglicosidasa F y posteriormente, se purificó el oligosacárido por cromatografía de exclusión molecular. El análisis de la composición de azúcares por cromatografía en fase líquida-gaseosa, así como también su liberación con enzimas específicas, permiten sugerir una estructura lactosamina de tipo complejo, con presencia de ácido siálico y ausencia de fucosa. Asimismo, el oligosacárido fue digerido secuencialmente con exoglicosidasas y analizado por cromatografía de intercambio aniónico a alto pH (Dionex). Dos estructuras diferentes, una de las cuales resulta similar a la descrita previamente para la transferrina humana, fueron observadas. Por otra parte, anticuerpos monoclonales dirigidos contra Uag y capaces de distinguir a éste de las transferrinas, no reconocen por dot blotting o ELISA al antígeno deglicosilado ni tampoco al antígeno desnaturalizado por SDS-PAGE y Western blotting. Así, se puede asignar al oligosacárido del antígeno urinario de *T. cruzi* un rol importante en la conformación molecular del Uag, capaz de modular su antigenicidad.

**PR4. Mapeo del genoma del *Trypanosoma cruzi*.** J BUA, J HOHEISEL, BM PORCEL, AM RUIZ.

Instituto Nacional de Parasitología "Dr. M. Fatale Chabón" Paseo Colón 568, Buenos Aires y Deutsches Krebsforschungszentrum, Im Neuenheimer Feld 280, Heidelberg, Alemania.

El proyecto de estudio del genoma del *Trypanosoma cruzi* lanzado por el Programa de Investigación y Entrenamiento en Enfermedades Tropicales (TDR) de la Organización Mundial de la Salud tiene como principal objetivo el secuenciamiento completo del mismo, permitiendo conocer la estructura de las moléculas que utiliza el parásito para establecer la infección y por lo tanto, identificar posibles blancos de ataque para su destrucción. Dentro del marco de este proyecto, nuestro laboratorio inició la construcción del mapa físico del genoma mediante la hibridación de filtros con una grilla de alta densidad donde sembró clones de una genoteca de cósmidos de la cepa de referencia CL Brener. Esta genoteca consta de 36.864 clones primarios individuales, cubriendo unos 25 equivalentes genómicos del parásito (Hanke et al. Biotechniques 21: 686, 1996). El objetivo del trabajo es ordenar la genoteca de cósmidos 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. Para ello, 1100 hibridaciones serán necesarias para obtener un mapa genético del parásito. Hasta ahora se realizaron 70 hibridaciones con pools de 12 y de 24 clones de cósmidos y unas 200 hibridaciones con clones de ADNc amplificados por PCR. Las hibridaciones con clones de

ADNc muestran una disminución del ruido de fondo respecto de los cósmidos marcados. Los resultados han sido leídos manualmente. Los clones positivos se analizaron por programas específicos para el análisis de genomas y procesados en una estación SUN SPARC-II. El ordenamiento de la genoteca de cósmidos de *T. cruzi* es una importante base para los proyectos de secuenciación del genoma del parásito, generando información crucial para el desarrollo de drogas tripanocidas, inmunoterapéuticas y herramientas de diagnóstico para la enfermedad de Chagas. Este trabajo recibió financiación del MSyAS de Argentina, de la RTPD network (SIDA/SAREC) y del TDR, WHO.

**PR5. Ácidos grasos libres y metaciclógenésis en *Trypanosoma cruzi*.** M WAINSELBAUM<sup>1</sup>, M FLORIN-CHRISTENSEN<sup>2</sup>, E LAMMEL<sup>1</sup>, S WILKOWSKY<sup>1</sup>, R DOCAMPO<sup>3</sup>, ED ISOLA<sup>1</sup>, J FLORIN-CHRISTENSEN<sup>2</sup>.

<sup>1</sup> Dpto. de Microbiología Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires, Paraguay 2155, 1121 Buenos Aires. <sup>2</sup> Instituto de Neurociencia (INEUCI), Ciudad Universitaria, Pab. II, 1428 Buenos Aires. <sup>3</sup> Laboratorio de Parasitología Molecular, Universidad de Illinois, Urbana, USA

Se ha demostrado que extractos intestinales del insecto hematófago *Triatoma infestans* estimulan la diferenciación de epimastigotes de *Trypanosoma cruzi* a tripomastigotes metacíclicos. Se ha aislado de esta fuente un fragmento de la  $\alpha^D$  globina de pollo que posee actividad metaciclógenica. En estudios anteriores, hemos hallado que la exposición de epimastigotes a los extractos intestinales provoca un incremento en el contenido de diacilglicerol y ácido graso libre. En el presente estudio, hemos observado que la exposición a un péptido sintético con la secuencia correspondiente a los aminoácidos 30 a 49 de la  $\alpha^D$  globina, que posee actividad metaciclógenica ( $\alpha^D$ -globin synthetic factor,  $\alpha^D$ -GSF) induce un notable aumento en la fracción de ácidos grasos libres, sin alterar significativamente el contenido de diacilglicerol. Los epimastigotes fueron cultivados en medio bifásico por 48 hs, resuspendidos en PBS + 1% seroalbúmina bovina con el agregado de 4  $\mu$ Ci [<sup>14</sup>C]oleico/10<sup>8</sup> células. Al cabo de 24 hs a 28°C, los parásitos fueron transferidos a medio de Grace (control) o medio de Grace suplementado con 1 a 10  $\mu$ M de  $\alpha^D$ -GSF. Luego de 5 min de incubación, los lípidos celulares fueron extraídos y analizados por TLC. Se encontró un aumento en el contenido de ácidos grasos de 1.5 a 3 veces sobre el control, dependiente de la dosis de péptido. Asimismo, se halló que concomitantemente, se produce un marcado incremento de lisofosfatidiletanolamina. Estos resultados sugieren que el  $\alpha^D$ -GSF estimula a una fosfolipasa de tipo A que actúa sobre la fosfatidiletanolamina, un fosfolípido mayoritario en los parásitos. Por otra parte, se encontró que el ácido oleico per se posee actividad metaciclógenica. Nuestros resultados indican que los ácidos grasos libres son una señal fisiológica importante en la diferenciación de

*Trypanosoma cruzi*. Este proyecto fue realizado con fondos de UBA y UNDP/WORLD BANK/WHO-TDR.

**PR6. Influencia del Atovaquone sobre el crecimiento y contenido de nucleótidos de adenina en *Crithidia fasciculata*.** AM BISCARDI, EM de PAHN, AOM STOPPANI.

Centro de Investigaciones Bioenergéticas, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires, Paraguay 2155, (1121) Buenos Aires, Argentina.

Atovaquone (ATQ) es una naftoquinona que actúa en tripanosomátidos inhibiendo el sistema de transporte de electrones mitocondrial, sin afectar al huésped, a la altura del complejo citocromo bc<sub>1</sub> (complejo III), por ser un antagonista de la ubiquinona. ATQ inhibe la enzima dehidro-orotato dehidrogenasa, bloqueando la biosíntesis de pirimidina, que no puede ser sintetizada «de novo» por el parásito y sí por el huésped. Se estudió la inhibición del crecimiento por ATQ en *Crithidia fasciculata* (cepa ATCC 11745), un tripanosomátido de la familia del *Trypanosoma cruzi*, no patógeno para el hombre. Alicuotas de un precultivo se inocularon en el medio de cultivo, previo agregado de ATQ en concentraciones de 0.46 a 6.5  $\mu$ M y se cultivaron 48 hs a 28°C con agitación. El crecimiento de los parásitos se determinó por turbidimetría. Se observó que el ATQ a estas concentraciones inhibió el crecimiento en forma pareja (81.9  $\pm$  7.6%). El contenido de nucleótidos de adenina se determinó por el método de la luciferina-luciferasa. Cultivos de 48 hs de crecimiento se incubaron hasta 4 hs con ATQ 0.5 y 3  $\mu$ M. El ATP descendió significativamente a las 4 hs con ATQ 3 mM (55%), no modificándose el ADP y aumentando el AMP (75%). El agregado de glucosa o glutamato (5 mM) al medio de incubación previene la caída de ATP producida por ATQ, siendo más efectiva la glucosa. Se concluye que directamente o por intermedio de «oxígeno activo» formado como consecuencia de ciclos redox, el ATQ produce una acción citotóxica expresada por una menor formación de ATP.

**PR7. Actividad poli (ADP-ribosa) polimerasa en núcleos de *Crithidia fasciculata*.** SH FERNANDEZ VILLAMIL, MP MOLINA PORTELA, AOM STOPPANI.

Centro de Investigaciones Bioenergéticas, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires, Paraguay 2155, (1121) Buenos Aires, Argentina.

La ADP-ribosilación de proteínas es una modificación postraducciona involucrada en numerosas funciones celulares. La poli(ADP-ribosa)polimerasa (PARP) es una enzima nuclear que cataliza la transferencia de unidades de ADP-ribosa desde el NAD<sup>+</sup> a proteínas nucleares bajo el estímulo de rupturas en el ADN y, estaría involucrada tanto en la diferenciación y transformación celular, como en la reparación del ADN. Isola y col. (Exp. Parasitol. 64:424-429,1987) han sugerido la participación de esta enzima en la diferenciación del *Trypanosoma cruzi*. El objetivo de este trabajo ha sido

determinar y caracterizar la actividad PARP en núcleos aislados de tripanosomátidos. Se aislaron núcleos de *Crithidia fasciculata* según Rubio y col. (Can. J. Biochem. 58:1247-1251, 1980) y se determinó la actividad PARP por la incorporación de  $^3\text{H}$  a proteínas precipitables con ácido tricloroacético utilizando  $^3\text{H-NAD}^+$  (Shah y col. Anal. Biochem. 227:1-13,1995). Los resultados obtenidos muestran que: a) la incorporación de  $^3\text{H}$  a proteínas fue proporcional hasta 1 mg de proteína nuclear. b) nicotinamida (10 mM), teofilina (10 mM) y 3-aminobenzamida (10 mM) inhibieron la actividad PARP 88, 90 y 99% respectivamente. c) la espermina en concentraciones hasta 1 mM estimuló la actividad PARP, mientras que a concentraciones mayores se observó inhibición de dicha actividad. d) la nicotinamida (10 mM) anuló el estímulo producido por espermina 1 mM. Los resultados obtenidos demuestran que la actividad PARP de *C. fasciculata* presentó características similares a las observadas en PARP de mamífero.

**PR8. Actividad de Anhidrasa Carbónica en *Toxoplasma gondii*.** V PSZENNY, G PEREDA, E BONTEMPI, S ANGEL, M MATRAJT, E GUARNERA, JC GARBERI.

ANLIS "Dr. Carlos G. Malbrán", Vélez Sarsfield 563, (1281), Buenos Aires.

*Toxoplasma gondii*, un protozoo parásito estrictamente intracelular, tiene la habilidad de inhibir la acidificación del fagosoma y bloquear su posterior fusión con el lisosoma. Los mecanismos por los cuales esto ocurre aún se desconocen. En este trabajo se describe la presencia de antígenos de taquizoitos de *T. gondii* con actividad de anhidrasa carbónica. Esta enzima de conocida participación en la regulación del pH en una variedad de organismos, podría jugar un rol importante en el establecimiento de los taquizoitos dentro de la vacuola parasitofora. Utilizando Azul de Bromotimol como indicador de pH, hemos detectado actividad enzimática en geles de poliacrilamida. Extractos parasitarios totales presentan tres bandas de actividad enzimática cuyos pesos moleculares aparentes fueron de 68, 66 y 64 kD, mientras que extractos de antígenos secretados-excretados (fracción ESA) muestran actividad enzimática en bandas de 68, 66, 15 y 13 kD. En experimentos de inmunoblot de extractos parasitarios totales un anticuerpo policlonal anti-anhidrasa carbónica II bovina hecho en ratón, reaccionó con tres bandas de peso molecular aparente de 66, 64 y 32 kD, mientras que en la fracción ESA cuatro bandas de 66, 32, 15 y 13 kD presentaron reactividad inmunológica. Experimentos de inmunofluorescencia sobre extendidos de taquizoitos provenientes de exudado peritoneal con el anticuerpo policlonal anti-anhidrasa carbónica II bovina mostraron una fuerte marcación en el extremo anterior del parásito. Estos resultados en conjunto revelan la presencia de una proteína con actividad de anhidrasa carbónica en *T. gondii* no descrita hasta el momento. La caracterización de esta nueva enzima y futuros estudios sobre su rol biológico podrían permitir

el diseño de inhibidores específicos con fines terapéuticos.

**PR9. Antigenicidad de la proteína Rop 2 de *Toxoplasma gondii* expresada en *Escherichia coli*.** V MARTIN, P ECHEVERRIA, G SANTILLAN, G CESPEDES, M MATRAJT, V PSZENNY, JC GARBERI, E GUARNERA, S ANGEL.

ANLIS-Dr. Carlos G. Malbrán, Av. Vélez Sarsfield 563, 1281, Buenos Aires.

Rop 2 es una proteína ubicada en la roproia de *T. gondii*, de la cual se demostró que es capaz de inducir inmunidad celular T-dependiente contra el parásito. A pesar de que un cDNA que codifica para Rop 2 fue detectado por rastreo inmunológico utilizando un pool de sueros humanos de personas con infección crónica de *T. gondii*, muy poco se ha estudiado sobre su valor antigénico frente a la respuesta humoral. Con dicho propósito, se clonó una región del gen Rop 2, excluyendo los sitios de clivaje de la proteína original, en el vector de expresión bacteriano pQE a partir de un plásmido recombinante cedido por K. Joiner (Universidad de Yale, USA). De esa manera, Rop 2 se expresa en *E. Coli* como una proteína de fusión Rop2<sub>196-561</sub> mas 6 residuos de histidina en la región aminoterminal para su purificación con resinas de níquel. La proteína de fusión pudo ser producida en grandes cantidades dentro de la hora de inducción con IPTG, presentando un tamaño aproximado de 42 kDa por electroforesis en poliacrilamida en condiciones reductoras. Cinco sueros humanos con títulos de IgG anti-*T. gondii* entre 256-1024 e IgM negativos reaccionaron contra la proteína de fusión por Western blot. El suero control no reaccionó en el mismo ensayo. Rop 2 pareciera estimular una fuerte respuesta humoral en el paciente con infección crónica. La proteína de fusión pQE-Rop 2 sería una herramienta apropiada para estudiar con mayor profundidad el valor antigénico de Rop 2 y plantear experimentos de inmunogenicidad.

**PR10. Dos familias de ADN repetitivo se encuentran estrechamente ligadas en el genoma de *Toxoplasma gondii*.** M MATRAJT, S ANGEL, V PSZENNY, E GUARNERA, J GARBERI.

ANLIS-Dr. Carlos G. Malbrán, Velez Sarsfield 563, (1281), Buenos Aires.

Dos familias de ADN repetitivo de *Toxoplasma gondii*, ABGTg7 y ABGTg8 fueron secuenciadas y caracterizadas. Una de ellas, ABGTg7 (721pb), resultó pertenecer a una familia de ADN repetitivo en tandem, con un tamaño de monómero de aproximadamente 340 pb. Uno de los extremos de ABGTg8 (1002pb), denominado Tg8.3 (210pb) mostró compartir un alto grado de homología (75-78%) con monómeros de ABGTg7. El análisis por Southern blot de ADN genómico de *T. gondii* digerido con varias endonucleasas e hibridado con las sondas Tg8.1 (1-513 en ABGTg8) y Tg8.2 (265-780 en ABGTg8), que cubren ABGTg8 excluyendo la región de Tg8.3, nos permitió identificar la presencia de otro ele-

mento repetitivo dentro de ABGTg8 en la región de Tg8.2. El mismo Southern Blot muestra que Tg8.2 sigue un patrón de reconocimiento similar, aunque con menor número de bandas al obtenido con la sonda ABGTg7. Al realizarse un Southern blot con los cromosomas de *T. gondii* separados por Pulse Field Gel Electrophoresis (PFGE), resultó que tanto la sonda ABGTg7 como Tg8.2 hibridaron con los cuatro cromosomas de mayor peso molecular del parásito. Los análisis de sensibilidad realizados con la exonucleasa Bal 31 demostraron que ambas familias de ADN repetitivas parecieran no ocupar un lugar preferencial a lo largo de los cromosomas, detectándose tanto cerca de los extremos como en regiones internas de los mismos. El rastreo de una genoteca de ADN genómica de *T. gondii* hecha en Lambda Dash II, rescató un fago recombinante, donde Tg8.2 se encuentra asociado a elementos de ABGTg7 incompletos. Se concluye que ABGTg7 pertenecería a la familia repetitiva en tandem más representativa de *T. gondii*, con algunas características de ADN satelital, que presenta un alto grado de polimorfismo entre monómeros, y sometida a fuertes modificaciones evolutivas; mientras que la familia repetitiva Tg8.2, tendría una menor representación en el genoma del parásito, y pareciera acompañar predominantemente al cluster de ABGTg7.

**PR11. The cytosome of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes is associated to the flagellar complex.** K OKUDA<sup>1</sup>, M ESTEVA<sup>2</sup>, EL SEGU-RA<sup>2</sup>, AT BIJOVSKY<sup>1</sup>.

<sup>1</sup> Depto. Parasitología, ICB-USP, São Paulo, Brasil. <sup>2</sup> INDIECH, Bs. As. Argentina.

Proliferative forms of *T. cruzi*, amastigotes and epimastigotes, have a cytosome, a specialized structure formed by an invagination of the flagellar pocket's membrane surrounded by microtubules and frequently followed by a row of vesicles. All this assemblage penetrates deeply into the cytoplasm overpassing the nucleus. This structure appears to play an important role in the nutrition of the parasite. We demonstrated that the monoclonal antibody FCH-F8-4, made-up against isolated flagellar complex of *T. cruzi* epimastigotes, recognizes a polypeptide with molecular weight around 85 kDa both in detergent soluble and insoluble fractions of epimastigotes. Immunofluorescence assays show the antigen as a small structure at the flagellar pocket region. Immunogold labeling of ultrathin sections of epimastigote forms reveals gold particles at the opening of flagellar pocket, concentrated on the cytosome region. Immunocytochemistry of epimastigote whole-mount cytoskeletons reveals the labeling on an array of 3-4 microtubules that appears attached to flagellum, running in the direction of the nucleus. Ultrastructural observations of isolated flagella show, in their posterior region, at the level of the flagellar pocket, the presence of a microtubular structure compatible with the cytosome. Supported by FAPESP and CNPq. K.O. is a fellow of FAPESP.

**PR12. Fosfolipasas A del *Trypanosoma cruzi*: identificación y caracterización.** B.M. PEREIRA, MA RODRÍGUEZ, C CORONEL, HD LUJÁN, DH BRONIA.

Facultad de Ciencias Médicas. Universidad Nacional de Córdoba, CC 35, Suc. 16. CP 5016. Córdoba.

En las primeras etapas del proceso de internalización, el *Trypanosoma cruzi* se encuentra dentro de una vacuola formada por fusión de lisosomas con la membrana plasmática de la célula huésped. Las bases moleculares de este proceso son desconocidas debido, en parte, a la dificultad que representa la identificación de los cambios bioquímicos que ocurren en esas membranas y que las capacitan para su fusión. Aunque los eritrocitos humanos no son invadidos por el *T. cruzi*, su bien conocida estructura y composición y la capacidad del parásito de adherirse a la superficie de los mismos *in vitro* nos ha permitido observar que el incremento en sus membranas de ácidos grasos libres y lisofosfolípidos produce fusión de los eritrocitos. Estas evidencias permitieron inferir la participación de fosfolipasas en el proceso de desestabilización de membranas celulares y posiblemente en la invasión del parásito a las células del huésped. Además, el pretratamiento del parásito con inhibidores de fosfolipasas A2 (PLA2) suprimió la fusión de los eritrocitos y los cambios bioquímicos asociados. Las PLA2 son importantes en varios procesos celulares fundamentales. Las PLA2 citosólicas (cPLA2; 85 kDa) participan en el metabolismo fosfolípido y en la generación de segundos mensajeros y las PLA2 secretorias (sPLA2; 14 kDa) en mecanismos de toxicidad e inflamación. Las PLA2 participan además en la invasión de varios microorganismos intracelulares. En este trabajo, utilizando métodos fluorométricos y radiométricos, hemos detectado actividad de PLA2 y PLA1 en varias fracciones subcelulares del parásito y estudiado sus propiedades bioquímicas. Además, utilizando antisueros contra sPLA2 porcina o de veneno de cobra y otro contra cPLA2 humana detectamos la existencia de ambas PLA2s en diferentes estados evolutivos del *T. cruzi*. La purificación, clonado y secuenciado de estas enzimas permitirá comprender el mecanismo de acción de estas enzimas, su regulación durante el desarrollo del parásito y su participación en el fenómeno de penetración a las células del huésped.

**PR13. Caracterización isoenzimática de *Trypanosoma cruzi* del nordeste de Argentina.** MJF REA<sup>1</sup>, CE BORDA<sup>1</sup>, ZA ANDRADE<sup>2</sup>, SE ANDRADE<sup>2</sup>.

<sup>1</sup> Centro Nacional de Parasitología y Enfermedades Tropicales, Facultad de Medicina, UNNE, Santa Fe 1.432, Corrientes, Argentina. Telefax 54-783-25484; <sup>2</sup> Centro de Pesquisas Gonçalo Muñoz, Salvador, BA, Brasil.

Desde 1987 se mantienen tres cepas de *Trypanosoma cruzi*: San Luis (SL) y Apipé Grande (AG) aisladas de *Triatoma infestans* capturadas en viviendas

de esas localidades de Corrientes y Dorotea (D) del xenodiagnóstico de una enferma, originaria de Formosa. Se intentó infectar sin éxito hasta 30 días de observación «baby» de *Mus musculus* variedad albina con inóculos que contenían 10% de trypomastigotes. Luego los animales inoculados fueron sometidos a la inmunosupresión de 250mg/kg de ciclofosfamida. Las cepas AG y SL presentaron parasitemia, aunque muy baja (50 tryp/50 campos 400x). Para la caracterización isoenzimática se cultivaron en el medio de Warren. Con extractos obtenidos por conge-lamiento y descongelamiento repetidos se realizaron los análisis electroforéticos de las enzimas GPI, PGM, ASAT y ALAT (Miles y de Andrade). Se usaron como parámetros las cepas Peruana, San Felipe y Colombiana. Los perfiles obtenidos permiten clasificar las tres cepas (SL, AG y D) como correspondiente al IS-2a de acuerdo con la clasificación de Tibayrene considerada como Z2a.variante del 22 de Miles. Este zimodema corresponde al perfil enzimático de la cepa Pemana, un tipo biológico (I) altamente virulento, con precocidad en la parasitemia y alta letalidad para el ratón. Sin embargo, estas cepas tuvieron muy baja virulencia para ese roedor debido, probablemente, a su mantenimiento prolongado en cultivos. Trabajo financiado por la Secretaría General de Ciencia y Técnica de la UNNE.

**PR14. Efectos de 2-cloro-3,7-diisopropoxifenotiazina sobre el desarrollo del *Trypanosoma cruzi*. AM BRIGADA, S MARENGO, M PESCHANKER, B BASSO, E MORETTI.**

*Centro Regional de Estudios Avanzados, Gobierno de la Provincia de San Luis, Avda del Fundador s/n. Puente Blanco.(5700) San Luis.*

La enfermedad de Chagas continúa siendo una de las endemias de mayor impacto en nuestro país. El tratamiento con los fármacos actualmente disponibles es efectivo durante la fase aguda y en la infección neonatal, presentando en cambio, resultados controvertidos en cuanto a su eficacia durante la fase crónica y, además, poseen efectos tóxicos que limitan su utilización. Por ello, el ensayo de potenciales nuevos agentes quimioterapéuticos es una de las líneas prioritarias en la investigación sobre esta enfermedad. Existe un gran potencial en el diseño de drogas que inhiban específicamente la actividad de la tripanotión reductasa. Estructuras análogas a la clorpromazina poseen cierto grado de selectividad en ese sentido, por lo que su preparación y análisis podrían dar origen a una nueva familia de drogas con actividad antiparasitaria. En el presente trabajo se analizó la actividad de un derivado de la clorpromazina, el 2-cloro-3,7-diisopropoxifenotiazina, sintetizado en nuestro laboratorio, sobre el crecimiento de formas epimastigotes de *T. cruzi*. Este derivado pertenece a la familia de las difenilaminas, precursoras del ciclo básico de las fenotiazinas. La droga fue solubilizada en Dimetilsulfóxido (DMSO), y agregada a cultivos bifásicos de *T. cruzi* cepa Tulahuén, en concentraciones de 5 a 100ug/ml. Como control se realizaron

cultivos con y sin el agregado de DMSO. A concentración de 5ug/ml se comprobó una parcial inhibición del desarrollo de los parásitos. A partir de 20ug/ml se observó un efecto parasiticida, el cual fue mas evidente a mayores concentraciones, llegando a lisar el 100% de los parásitos antes de 24 hrs., cuando se ensayó con 70 y 100ug/ml. Estos resultados alientan la prosecución de los estudios con otros derivados, cuya síntesis se encuentra actualmente en curso, como asimismo el análisis de la actividad frente a los otros estadios del *T. cruzi*.

**PR15. Variación en el número de recambio de  $^{32}$ P-fosfolípidos de *Trypanosoma cruzi* inducida por interacción con glóbulos rojos humanos. G RACAGNI, M GARRIDO, M RODRÍGUEZ, M PEREIRA, D BRONIA, E MACHADO-DOME-NECH.**

*Química Biológica, Fac. de Cs. Médicas, UNC y Dpto. de Biología Molecular, UNRC.*

La internalización del *T. cruzi* (Tc) a la célula blanco implica fenómenos de fusión de membranas y cambios bioquímicos en ambas células. En la interacción de epimastigotes con glóbulos rojos humanos (GR), utilizado como modelo experimental in vitro, se han demostrado cambios a nivel protéico y lipídico, algunos de los cuales estarían relacionados con la fusión de los GR entre sí que ocurre en presencia de calcio (Luján, H. y Bronia, D., *Parasitol.* 108:323, 1994). Con el objetivo de estudiar las variaciones en los fosfolípidos de ambas células, éstas se marcaron con [ $^{32}$ P]Pi y se realizó la interacción durante una hora en presencia y ausencia de calcio. Para la separación de los GR y Tc se implementó una técnica de centrifugación en gradiente de ficoll/triosom que permitió un alto grado de enriquecimiento, bajo grado de contaminación y conservación de la morfología de cada fracción celular. Los fosfolípidos extraídos fueron analizados por cromatografía en capa delgada, autoradiografía y centellografía líquida. Los resultados encontrados hasta el momento indicaron que el contacto de los epimastigotes con los GR desencadenó una serie de cambios que involucran algunas especies fosfolípicas del *T. cruzi*. Un incremento en las fracciones de fosfatidiletanolamina (PE) y de fosfatidilinositol/lisofosfatidiletanolamina (PI/LPE) y un descenso en la de ácido fosfatídico (PA) dependió de la presencia de calcio (condiciones fusogénicas), mientras que la disminución observada en fosfatidilcolina (PC), aparentemente compensada con un aumento de su lisoderivado (LPC), fue independiente de calcio, por lo que sería una consecuencia del contacto celular. El descenso en PA se relacionaría con un posible intercambio lipídico entre estas células ya que se ha demostrado previamente un aumento de diacilglicerol en la membrana del GR. Los resultados encontrados a nivel de los fosfolípidos del Tc, estarían en concordancia con la disminución encontrada en la relación entre la proporción de marca (cpm) de las fases lipídicas y las proteínas celulares provocada por la interacción *T. cruzi*-glóbulo rojo.

**PR16. Modificaciones en la actividad de glutamato deshidrogenasa en *Trypanosoma cruzi* durante la incubación con glóbulos rojos.** MS REMEDI, PY SCARAFFIA, M RODRIGUEZ, DH BRONIA, NM GEREZ DE BURGOS.

*Cát. Química Biológica, Fac. de Cs. Médicas, Univ. Nac de Córdoba, CC 35, Suc. 16, Córdoba, Argentina.*

La penetración del *Trypanosoma cruzi* en células huésped es una etapa indispensable para dar origen a las formas replicativas del parásito y cumplir su ciclo de vida. Nuestro grupo de trabajo ha estudiado cambios bioquímicos que ocurren en el parásito durante la incubación con glóbulos rojos humanos (GR). El *T. cruzi* aunque no invade los eritrocitos, induce fusión en los mismos. En trabajos previos se estudió actividad de enzimas involucradas en la producción de energía (glicólisis y ciclo de Krebs), como así también en el metabolismo de los aminoácidos en *T. cruzi* post-inducción de la fusión de eritrocitos humanos. Dada la marcada disminución observada en la actividad enzimática de glutámico deshidrogenasa dependiente de NADP (GDH), producida en epimastigotes de *T. cruzi* durante la incubación con GR, nos propusimos estudiar el mecanismo de inhibición de la GDH utilizando parásitos intactos (PI) y lisados (PL). La actividad específica de GDH en PI incubados con GR, en condiciones que promuevan la fusión de los mismos, fue 50% más baja que en los epimastigotes control (ausencia de eritrocitos). No se observaron diferencias significativas cuando la incubación se realizó con GR lisados. Por el contrario, cuando los PL fueron puestos en contacto con GR se observó una activación de GDH. La actividad específica de GDH en los mismos fue 40% más alta que en los parásitos control. En experimentos donde los GR fueron reemplazados por igual concentración de albúmina, no se registró esta activación, descartándose un posible efecto protector del GR sobre el parásito. Cuando se determinó actividad de GDH en PL incubados con distintas cantidades de GR equivalentes a: 11,8 ; 23,6 ; 35,4 ; 47,2 y 59 mg de proteínas, se observó un incremento en la actividad específica dependiente de la concentración de proteínas. Los valores promedio fueron, con respecto al control, 25%, 54%, 77%, 97% y 97% más altos respectivamente. En contraposición a esto, cuando los GR fueron calentados a 60°C por 20 min. la actividad de GDH disminuyó un 50%. Estos resultados indicarían que los cambios en la actividad de GDH durante la incubación con GR son dependientes de la integridad del parásito.

**PR17. *Trypanosoma cruzi*: variaciones de actividades GDH y MDH en respuesta a cambios estructurales del plasmalema.** RODRÍGUEZ M., PIPET G., COSSY ISASI S. y BRONIA D.;

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

Glicosfingolípidos sialilados y moléculas semejantes son constituyentes del plasmalema del parásito pero respecto a su relevancia en eventos biológicos los conocimientos son escasos. En esta línea de trabajo, experimentos previos revelaron variaciones en la curva de crecimiento de formas epimastigotes cultivadas en medio suplementado con gangliósidos. La presencia de gangliósidos provocó inhibición in vitro de una actividad PLA en epimastigotes y tripomastigotes. Distintas fases de la curva de crecimiento y el cambio de forma del parásito se correlacionan con cambios en las actividades de enzimas del metabolismo glucolítico y de aminoácidos. Las mismas enzimas podrían participar en la respuesta de corto plazo a cambios estructurales del plasmalema producidos por agregado de gangliósidos al medio de cultivo. En experimentos preliminares se determinaron cambios en las actividades GDH NADPH<sub>2</sub> dependiente y MDH NADH<sub>2</sub> dependiente inducibles por gangliósidos exógenos. Los parásitos (epimastigotes) se cosecharon a los días 4 (fase pre-exponencial); 7 (fase exponencial); 14 (fase estacionaria); y 21 (fase de declinación) y luego de lavados con solución fisiológica se incubaron con gangliósidos 300 mM en medio de Eagle modificado por Dulbecco sin suero, 18 horas previo a la determinación. Se observó para GDH un incremento a 4 (150 %) y a 14 ( 63 %) días y disminución a 7 ( 63 %) y 21 (38 %) días. En el caso de MDH hubo un incremento ( 54 %) a 4 días y disminución a 7 ( 20 %); 14 ( 30 %) y 21 ( 55 %) días. En parásitos de 4 y 7 días incubados a mayor densidad pero igual concentración de gangliósidos, las diferencias respecto a los controles desaparecieron para GDH. En cambio la actividad MDH disminuyó ( 74 %) a 4 días y a 7 días se anuló la diferencia. Los gangliósidos exógenos son detectables por cromatografía en capa fina del extracto lipídico del parásito, lo que permite suponer su incorporación al plasmalema o al menos una interacción muy fuerte. Estos resultados preliminares indicarían que es posible modificar el metabolismo del parásito induciendo rearrreglos estructurales de la membrana plasmática por tratamiento con gangliósidos.

**PR18. Acción tripanomicida de compuestos sintéticos derivados de inhibidores del crecimiento celular.** LE FICHERA\*, M ESTEVA\*, AJ SCHVARTZAPEL\*\*, JB RODRIGUEZ\*\*, EL SEGURA\*, EG GROS\*\*.

*\*Instituto Nac. de Parasitología "Dr.M. Fátala Chaben" Paseo Colón 568, Bs. As. \*\*Dto. Quím. Orgánica Fac. Cs. Exactas y Naturales, UBA, Bs. As.*

El objetivo de nuestro trabajo es evaluar biológicamente derivados de la hormona juvenil y del Fenoxycarb, sobre cultivos de *Trypanosoma cruzi* para la esterilización de la sangre a transfundir. Fueron sintetizados 19 compuestos isoprénicos y no-isoprénicos, con modificaciones en la estructura básica y en algunos grupos terminales, basados en estudios previos que mostraron disminución del crecimiento de epimastigotes

(Schvartzapel A. et al. 1995) y lisis en tripomastigotes sanguíneos (Fichera L. et al. 1995). Diferentes concentraciones de los compuestos fueron incubados con sangre de ratón infectado con tripomastigotes ( $5 \times 10^5$  par/ml) durante 24 hs a  $4^\circ\text{C}$ . Diez compuestos mostraron efecto lítico sobre los tripomastigotes sanguíneos. Con 0.75 mM los compuestos isoprénicos 31 y 34 lisaron el  $91.5 \pm 9.6$  y  $96.95 \pm 5.06$  % y a 1.5mM el efecto fue de  $97.4 \pm 6.2$  y  $99.73 \pm 0.59$  %. Con esta concentración los fenoxi-derivados 30 y 36 lisaron los parásitos en un  $97.07 \pm 2.5$  y  $98.0 \pm 7.0$  % y con 0.75mM el efecto fue menor ( $84.7 \pm 10.1$  y  $81.5 \pm 6.0$  %). La toxicidad de las drogas están siendo evaluadas en cultivos de células musculares. Estos resultados nos llevan a continuar con el estudio de nuevos compuestos para lograr drogas más activas e inocuas para su utilización en bancos de sangre.

**PR19. Identificación y caracterización en *Trypanosoma cruzi* de proteínas homólogas a la glutatión-S-transferasa de 26 kDa de *Schistosoma japonicum*.** GA GARCIA, MI ESTEVA, E BONTEMPI, J BUA, AM RUIZ.

Instituto Nacional de Parasitología -Dr. Mario Fatala Chabén-, Paseo Colón 568, (1063) Buenos Aires.

Las glutatión-S-transferasas (GSTs) son un grupo de enzimas involucradas en la detoxificación que catalizan la conjugación del glutatión reducido con compuestos electrofílicos nocivos para la célula. Las GSTs de *Schistosoma* son un blanco potencial para inmuno y quimioterapia contra la enfermedad que dichos parásitos provocan. Si bien se detectó actividad para dicha enzima en *Trypanosoma cruzi*, aún no se caracterizó totalmente alguna glutatión o trypanotión-S-transferasa. El objetivo de este trabajo es la identificación de enzimas homólogas a la GST de 26 Kda de *Schistosoma japonicum* (GSTsj) expresada por el plásmido pGEX1 en *T. cruzi*, ya que se observó reactividad de un antisuero contra esta proteína sobre antígenos de este parásito. A partir de la fracción citosólica de epimastigotes de la cepa Tulahuén (stock Tul 2) se purificó por inmunofinidad, utilizando anticuerpos purificados del mencionado antisuero, un grupo de proteínas homólogas a la GSTsj (PHGSTsj). En electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS la fracción PHGSTsj mostró tener al menos diez proteínas con un peso molecular entre 10 y 56 Kda. Una de ellas de 11.7 Kda fue seleccionada para realizar la secuencia N-terminal y se observó que los primeros quince aminoácidos mostraron homología con enzimas de óxido reducción de distintos organismos, entre ellas algunas pertenecientes a la familia de las flavoenzimas transhidrogenasas, indicando la posible presencia de una enzima que participe del metabolismo del glutatión en *T. cruzi*, ya que tanto la glutatión reductasa de mamíferos como la trypanotión reductasa de *Trypanosomatidos* pertenecen a esta familia. Se realizó un rastreo inmunológico en una genoteca de *T. cruzi* que permitió identificar varios

clones. Algunos mostraron tener insertos de 4500 pb y actualmente se está procediendo a la secuenciación de los mismos a fin de caracterizar genéticamente a estas proteínas que podrían constituirse en posibles blancos de ataque para la destrucción del parásito. Este trabajo recibió financiación del MSyAS de Argentina, de la RTPD network (SIDA/SAREC) y del TDR, WHO.

**PR20. Variaciones en los niveles de inositol trifosfato y calcio intracelular en epimastigotes de *Trypanosoma cruzi* estimulados.** M BOLLO, MN GARRIDO, EE MACHADO- DOMENECH.

Dpto. Biología Molecular, FCEFQ, Univ. Nac. de Río Cuarto, Río Cuarto.

Nuestro grupo de trabajo demostró, por primera vez, en *Trypanosoma cruzi* la actividad de PLC mediante cambios observados en componentes fosfolipídicos y solubles luego del agregado de carbacol. Recientemente observamos que este agonista también provoca variaciones en la concentración de calcio intracelular ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ). Además, resultados obtenidos con el ester de forbol TPA, sugirieron un papel regulador de PKC sobre las actividades de DAG-quinasa y fosfoinositido-quinasas. Por otro lado, cuando se utilizó un fragmento de la  $\alpha$ -globina de pollo (péptido 1-40), capaz de inducir la metacicloogénesis en el parásito y estimular la adenilato ciclasa, observamos aumentos en los niveles de inositol trifosfato (IP3). En base a estos antecedentes, nuestro objetivo fue estudiar cambios probables en la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  inducidos por la presencia del péptido 1-40 e investigar el compromiso de PKC en la regulación de la actividad PLC y en la señal de calcio intracelular del parásito. En este trabajo, los inositoles fosfato se resolvieron por cromatografía en Dowex AG 1-X8 mediante gradiente de formiato de amonio y el calcio intracelular fue medido en suspensiones de células con Fura2- AM. Los resultados demostraron que la estimulación de los parásitos con el péptido 1-40, provocó una rápida elevación de  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ . La preincubación de las células durante 20-30 minutos con TPA, no modificó la magnitud de la respuesta del calcio. En estas condiciones, los niveles de IP3 obtenidos a los 3 minutos del agregado del agonista, no variaron sustancialmente con respecto al control no estimulado; sugiriendo que, en el tiempo estudiado, la actividad PLC no estaría bajo el control de PKC. Cuando se estudiaron los efectos de una preincubación de 30 minutos con TPA en la estimulación con carbacol, se observaron variaciones de calcio intracelular que fueron semejantes a las del control estimulado. Sin embargo, esta preincubación con TPA fue capaz de anular el aumento en los niveles de IP3 que se observan al minuto de agregado el agonista. Estos resultados sugieren que PKC modularía la actividad PLC. Además, contribuiría indirectamente a la señal de calcio intracelular del parásito; de esta manera, los cambios en los niveles de IP3 no serían el único requerimiento para provocar la movilización de calcio intracelular luego de un estímulo muscarínico.

**PR21. Respuesta de dos cepas de *T. cruzi* a la adición al medio de extractos crudos de vegetales.** JA OPPEZZO, RA MARTINEZ, MC MIGLIETTA, MA BARRIOS, HF MIGLIETTA.

CIEN, Facultad de Bioquímica y Cias. Biológicas, UNL. Pje. El Pozo, 3000 Santa Fe.

En trabajos anteriores informamos sobre la respuesta de dos cepas de *T. cruzi* a la adición al medio de cultivo de extractos crudos de vegetales. En este trabajo completamos la comunicación con el ensayo de otros extractos. Se ensayaron extractos crudos de las partes vegetativas de *Braccharis crispera*; hojas de *Pneumus boldus*; corteza y hojas de *Erythrina cristagalli*, a las concentraciones de 5,0 mg res. seco/l y 20,0 mg res. seco/l en cultivos monofásicos agitados de las cepas Tuluahuén O -TO y Tuluahuén 2 -T2- de *T. cruzi*, evaluándose la densidad celular en función del tiempo. Los resultados muestran que *B. crispera* deprime el desarrollo de T2 independientemente de la concentración y estimula TO inversamente a la concentración. El extracto de *P. boldus* deprime el desarrollo de TO y T2 en ambas concentraciones, en relación directa. *E. cristagalli* -corteza- deprime el desarrollo de T2 a la menor concentración y estimula levemente en la mayor concentración. Con respecto a TO, la deprime en relación directa a la concentración. *E. cristagalli* -hojas- deprime a T2 en relación directa a la concentración y a TO inversamente a la concentración. Se concluye que: 1) Extracto de diferentes especies vegetales o partes de un mismo vegetal tienen diferentes efectos en el desarrollo del *T. cruzi* en cultivos monofásicos agitados. 2) Los efectos sobre el desarrollo no necesariamente dependen de la concentración. 3) Diferentes cepas de *T. cruzi* presentan distintos comportamientos en su desarrollo frente a la presencia en el medio del extracto de un mismo vegetal.

**PR22. Fosfolípidos de *Trypanosoma cruzi*: un nuevo producto metabólico del ácido fosfatídico.** N MARCHESINI, G HERNANDEZ, V SANTANDER y E MACHADO-DOMENECH.

Química Biológica, Universidad Nacional de Río Cuarto 5800 Río Cuarto, Córdoba.

El ácido fosfatídico (PA), producto de la actividad diacilglicerol quinasa (DAG-k) o fosfolipasa D (PLD), puede desencadenar respuestas mitogénicas y regular las actividades de diferentes enzimas como PKC, la proteína activadora de la actividad GTPasa de la Ras (RasGAP) y de la fosfatidilinositol-4-fosfato quinasa (PIP-k). Además, el PA puede ser metabolizado a diacilglicerol pirofosfato (DAGPP) por la fosfatidato quinasa PA-k, encontrada sólo en diferentes tejidos vegetales. Estudios realizados en nuestro laboratorio evidenciaron que *Trypanosoma cruzi* presenta la capacidad de responder a estímulos externos mediante la variación de los niveles de polifosfoinosítidos, PA y calcio citosólico. Así, nuestro objetivo fue, estudiar la regulación de los niveles del ácido fosfatídico, luego de su estimulación y determinar la participación de la

fosfatidato quinasa en membranas de epimastigotes de *T. cruzi*. Las células cultivadas durante 6 días a 28 °C, se cosecharon y homogenizaron. La estimulación con PLD exógena se llevó a cabo durante 1 h en presencia del amortiguador KRT con glucosa y albúmina 1,8 % y 0,25 %, respectivamente. Cuando las lípido quinasa, presentes en la preparación de membranas, fueron incubadas en presencia de 1 mM [ $\gamma^{32}$ ]ATP, con o sin el agregado de PA exógeno (dioleoil o dipalmitoil PA) se obtuvieron tres compuestos radiactivos. Dos de ellos fueron productos de las conocidas lípido quinasa DAG-k y PI-k y uno con un valor de Rf similar al DAGPP. La formación de este último fue dependiente del tiempo, pH, temperatura y concentración del fosfatidato. Sin embargo, bajo iguales condiciones, las membranas calentadas 30 min. a 95 °C también evidenciaron la presencia de dicho compuesto. Resultados similares se observaron en las membranas tratadas con PLD, respecto al control. Este hecho indicaría que el DAGPP es un lípido minoritario cuya concentración aumenta cuando se incrementa una señal. El presente estudio puede tener implicancias importantes para la regulación de la respuesta celular a través de agonistas que induzcan variaciones en el metabolismo de los polifosfoinosítidos y ácido fosfatídico.

**PR23. Optimización de la purificación de una proteína simil lectina de *Trypanosoma cruzi* mediante cromatografía de afinidad sobre matriz agarosa.** E WELCHEN, I MARCIPAR A SILBER, A MARCIPAR.

Instituto de Tecnología Biológica (INTEBIO) - U. N. L. Ciudad Universitaria, C. C. 530 Paraje «El Pozo» (3000) Santa Fe, Argentina. Tel. (54) (42) 531532 Fax: (54) (42) 555169.

El *T. cruzi* agente etiológico de la enfermedad de Chagas, debe obligatoriamente invadir células para completar su ciclo de vida en el huésped. La fase de reconocimiento, en las etapas tempranas del proceso de penetración, involucra fundamentalmente a residuos glucídicos de los glicoconjugados de membrana presentes, tanto en la superficie de las células del huésped como en la superficie del parásito. En nuestro laboratorio se ha obtenido a partir de células del *T. cruzi* una glicoproteína simil lectina con capacidad de unión a residuos galactosa de las membranas celulares del huésped, de 65 kDa de peso molecular aparente. La purificación de esta glicoproteína fue llevada a cabo originalmente utilizándose como matriz de afinidad una columna de membranas desializadas de glóbulos rojos humanos, entrecruzados con albúmina. Con la proteína purificada en esta matriz se inocularon conejos con la finalidad de obtener sueros hiperinmunes que por Western Blot contra lisados de parásitos, mostraron una banda amplia de peso molecular compatible con el de la proteína purificada. Sin embargo, por la técnica de ELISA, estos sueros mostraron además una fuerte reactividad cruzada con otros antígenos de membranas de la familia de la cruzipaina. Frente a esto se decidió optimizar la estrategia de purificación de la proteína

símil lectinas utilizando los residuos galactosa expuestos por la agarosa (polímero de galactosa). A partir de la elución de esta columna, previamente enfrentada a extractos de parásitos, purificamos una proteína del mismo peso molecular que la descrita anteriormente, con la que se obtuvieron sueros que no presentaron la reacción cruzada antes descrita. Esto nos permite inferir que la proteína en estudio no comparte epitopes con la cruzipaina, y que la purificación por afinidad sobre agarosa es más específica que las purificación sobre membranas de eritrocitos desializados.

**PR24. Anticuerpos anti-galactosa y su purificación en una columna de agarosa.** MG RISSO, IS MARCIPAR, AM SILBER.

*Instituto De Tecnología Biológica (Intebio), Facultad De Bioquímica Y Ciencias Biológicas (UNL).*

Los anticuerpos anti-galactosa son anticuerpos naturales, cuyo nivel en suero se encuentra aumentado en pacientes que padecen infecciones por agentes como *Vibrio cholerae*, *Staphylococcus aureus* y *Trypanosoma cruzi*, entre otros. Entre los determinantes antigénicos más significativos que el *T. cruzi* presenta al sistema inmune se encuentran los residuos galactosil de los glicoconjugados de membranas. Dado que la agarosa es un polímero de galactosa (d-galactosa alternada con 3,6 anhidro - 1 - galactosa), se decidió evaluar la capacidad de esta matriz como superficie de captura para anticuerpos anti-gal de sueros de personas chagásicas por inmunofluorescencia, para su posterior caracterización. Estos anticuerpos fueron purificados fraccionando mezclas (pools) de sueros provenientes de pacientes chagásicos crónicos en columnas de agarosa. Se eluyó por desnaturación con solución de glicina-ácido clorhídrico de pH 2,5. El material eluido de la columna a partir de mezclas de sueros fue corrido en un gel de poliacrilamida con sds. Se observaron únicamente las bandas correspondientes a las cadenas pesada y liviana de los anticuerpos (aproximadamente 60 y 40 kda). Mediante el uso de conjugados isotipoespecíficos se determina por Elisa la presencia de anticuerpos de tipo IgG. Se comprobó que a partir de las mezclas de sueros de pacientes chagásicos la cantidad purificada de anticuerpo fue muchas veces superior que la obtenida siguiendo el mismo protocolo con un pool de sueros de pacientes no chagásicos. La presencia de niveles basales de anticuerpos contra estos azúcares en sueros de personas no infectadas por el *T. cruzi* se debería a que durante la maduración del sistema inmune aparecen anticuerpos reactivos contra los residuos glucídicos de las bacterias constitutivas de la flora intestinal. Estos anticuerpos contribuirían a la inmunidad llamada innata o natural. Se está procediendo a un mapeo de la especificidad de estos anticuerpos por ensayos de competencia con azúcares solubles, así como a un estudio de la contribución de estos anticuerpos a la modulación de la respuesta frente a la infección en el huesped.

**PR25. Identificación, caracterización y evaluación de la relevancia antigénica de una glicoproteína de 65 kDa, aislada de *Trypanosoma cruzi*, que**

**posee actividad de reconocimiento de residuos Galactosa.** C ROODVELDT, I MARCIPAR, M GONZALEZ, E WELCHEN, A SILBER, A MARCIPAR.

*Instituto de Tecnología Biológica (INTEBIO) - U. N. L. Ciudad Universitaria, C. C. 530 Paraje «El Pozo» (3000) Santa Fé, Argentina. Tel. (54) (42) 531532 Fax: (54) (42) 555169.*

A partir de lisados de epimastigotes de *T. cruzi* se ha obtenido una proteína capaz de ligar residuos galactosa. La purificación se realizó por cromatografía de afinidad. Las matrices utilizadas consistieron en membranas eritrocitarias desializadas, y albúmina entrecruzadas con glutaraldehído. Los residuos expuestos en este sistema incluyen, entre otras, a la estructura D-Gal-b-(1-3)-D-GalNAc, que han sido descritos como intervinientes en las reacciones de reconocimiento huesped-parásito. Para eluir moléculas retenidas específicamente sobre estos sitios se utilizó una solución de galactosa (elución por competición de ligandos). El eluato fue analizado mediante las técnicas de SDS-PAGE y Western Blot. Se identificó una única banda de 65 kDa. Mediante ensayos con Concanavalina A-peroxidasa, se ha determinado la presencia de regiones de naturaleza glucídica en esta proteína. La localización intracelular de esta molécula fue determinada por inmunofluorescencia. Las regiones marcadas correspondieron fundamentalmente al sistema de membranas del retículo y el sistema de Golgi. Se evaluó por ELISA la reactividad antigénica de la glicoproteína purificada, sobre un panel de 103 sueros (53 negativos y 50 positivos). Para este antígeno se obtuvieron valores de especificidad y sensibilidad de 98,11% y 98% respectivamente. Estos resultados y la posible relación de esta glicoproteína con mecanismos de reconocimiento e interiorización, enfatizan el interés de su estudio como posible antígeno relevante desde el punto de vista diagnóstico y de su importancia en el estudio de la fisiopatología de la enfermedad de Chagas.

**PR26. Desarrollo de un ensayo para la determinación de avidéz de IgG específica para conocer la antigüedad de la infección por toxoplasmosis.** IS MARCIPAR\*, ML DALLA FONTANA\*\*, S FUSCO\*\*.

*Laboratorio de Investigación y Desarrollo de Lab. Gen Cell SRL. \*\*Laboratorio de Zoonosis del Programa de la Red de Laboratorios. Ministerio de Salud y Medio Ambiente de la Provincia de Santa Fe.*

La infección por *T. gondii* en la mayoría de los casos es asintomática. El feto en formación, en cambio, es muy sensible a la infección. Por eso, la detección de una infección activa en mujeres embarazadas constituye un objetivo importante. En esta parasitosis el diagnóstico serológico convencional (IgG, Anticuerpos totales o IgM) es insuficiente para definir el estado de la paciente. Por un lado, el gran porcentaje de seropositividad para la IgG específica en la población

no permite determinar entre una infección crónica o una infección aguda sin realizar por lo menos dos determinaciones seriadas. Por otro lado, la persistencia de altos títulos de IgM específica, en muchos casos después del año de la primoinfección, tampoco nos permite utilizar este parámetro para discriminar entre una infección activa o una infección reciente pero que ya ha pasado a cronicidad. En los últimos años se propuso la determinación de avididad de IgG específica para responder a esta falencia estudiando las condiciones de disociación Ag-Ac de los anticuerpos IgG con distintos agentes caotrópicos. En este trabajo se realizaron seguimientos de pacientes, desde el momento de la primoinfección determinada clínicamente, y se encontró la mejor correlación clínica y la más alta diferencia entre los distintos estadios de la infección, realizando eluciones seriadas de los anticuerpos retenidos por antígenos de *T. gondii* en placas de microlitulación con urea 3, 6, 8 y 10 M, luego revelando por la técnica de ELISA y calculando la pendiente de DO versus diluciones del agente caotrópico. La técnica mostró buena respuesta para diferenciar entre una infección activa y una infección reciente pero que ya ha pasado a cronicidad.

**PR27. kDNA PCR-based diagnosis and genetic identification of *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania* sp. clones.** SF BRENIERE, MF BOSSENSO, J TELLERIA.

UMR CNRS/ORSTOM n° 9926, Laboratoire de Génétique Moléculaire des parasites et des Vecteurs, La Paz, Bolivia

Kinetoplastidae parasites have an extra nuclear DNA, the kinetoplast DNA that present minicircles highly repeated in one cell. The minicircles of kDNA are composed of conserved regions flanking variable ones. The variable regions are candidate for development of sub-species DNA probes in Kinetoplastidae taxon presenting mainly a clonal structure. The general procedure was as follow: obtaining of variable regions minicircle kDNA probes by Polymerase Chain Reaction (PCR), study of the specificity of the probes by hybridization with variable regions obtained from a set of strains previously genetically characterized by multilocus isoenzyme typing. We fully demonstrate that the minicircle variable kDNA regions of *Trypanosoma cruzi* clones are specific of «sub-species» taxonomic clade and can be used as probes for detection of genetically similar clones. Moreover, the PCR amplification of the variable regions was applied in human blood and vectors feces. The products of amplification hybridized with specific probes allowed the direct detection of clones in the different hosts. Nevertheless, the sensitivity of the PCR appears to be variable according to the endemic area. Lastly, we defined a set of primers allowing the amplification of variable parts of kDNA of *Leishmania* sp. We also test the specificity of these products and observed a tight linkage between hybridization patterns and «complexes» of *Leishmania*. This method allowed

the identification of two potential mammal reservoirs in a recent Andean focus of *Leishmania amazonensis*. These results show that the variability, of the minicircles of Kinetoplastidae of parasite presenting clonal structure, can be used to differentiate genetic groups in each taxon. The kDNA PCR followed by hybridization confer a convenient tool for field epidemiology.

**PR28. Glicoproteínas aceptoras de ácido siálico en *Trypanosoma cruzi* clon CL 14.** ML SALTO<sup>1</sup>, M GONÇALVES<sup>2</sup>, W COLLI<sup>2</sup>, RM de LEDER-KREMER<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>CIHIDECAR Departamento de Química Orgánica, FCEyN, UBA. <sup>2</sup>Departamento de Bioquímica, Instituto de Química, Universidad de São Paulo, Brazil.

Las glicoproteínas de 35-50 kDa de *T. cruzi* presentan cadenas O-glicosídicas de estructura inusual unidas a la proteína por GlcNAc en lugar de GalNAc como ocurre generalmente. Se determinó que los oligosacáridos son los aceptores de ácido siálico en la reacción catalizada por trans-sialidasa. Por otra parte, en dos cepas estudiadas (G y Y) se encontró que los oligosacáridos se diferencian por la presencia (cepa G) de galactosa furanósica. Dada la importancia de este azúcar como determinante antigénico estudiamos ahora la estructura de las glicoproteínas en *T. cruzi* CL-14. Se utilizaron células epimastigote incorporadas con [<sup>3</sup>H]-glucosa y células no radioactivas, deslipidadas por sucesivas extracciones con cloroformo/metanol. Las glicoproteínas se extrajeron con agua saturada en butanol, se purificaron por cromatografía hidrofóbica en columna de Octil-Sefarosa CL-4B y se analizaron por SDS-PAGE. Se observó en una de las fracciones una banda ancha en la zona de 35-50 kDa que no se separa en tres bandas (ABC) como en el caso de las glicoproteínas aisladas de la cepa Y con las cuales se comparó. Los oligosacáridos con uniones O-glicosídicas se obtuvieron por β-eliminación reductiva y se analizaron por cromatografía de intercambio aniónico de alta resolución y detección por pulso amperométrico (DIONEX). La técnica de análisis se puso a punto con N-acetilglucosaminitol (GlcNAc-ol) y los oligosacáridos reducidos Gal(β1→4)GlcNAc-ol (A) y Gal(β1→4)(Galpβ1→6)GlcNAc-ol que fueron anteriormente caracterizados en las mucinas de la cepa G y sintetizados por primera vez en nuestro laboratorio (Gallo et al, 1996). Se determinó que el producto principal de la reacción de β-eliminación es GlcNAc, el cual se había determinado también como componente mayoritario entre los azúcares obtenidos de la cepa G (Acosta Serrano et al, 1995). Por el contrario, en la cepa Y la GlcNAc sin sustituir se encuentra como componente menor (Previato et al, 1995). Se está estudiando la estructura de los oligosacáridos liberados de la mucina en *T. cruzi* CL 14 con el fin de determinar si hay alguna correlación de los azúcares con las propiedades biológicas de la cepa.

**PR29. Trypanosoma cruzi: Modificación estructural de las cadenas N-glicosídicas de la glicoproteína Tc-85 cuando es liberada al medio de cultivo.** AS COUTO\*, R AGUSTI\*, MJ MANSO ALVES\*\*, W COLLI\*\*, RM de LEDERKREMER\*.

\*CIHIDECAR, Departamento de Química Orgánica, F.C.E.y N.- UBA, Argentina, y \*\*Departamento de Bioquímica, Instituto de Química, Universidad de San Pablo, Brasil.

Se postula que la presencia de antígenos circulantes en suero de pacientes infectados provocaría el daño de células no infectadas debido a la respuesta inmune dirigida contra ellos. Entre las numerosas proteínas de superficie, una glicoproteína específica del estadio trypomastigote, la Tc-85, ha sido involucrada en la adhesión y/o penetración del parásito a la célula huésped. La glicoproteína Tc-85 ha sido identificada entre los compuestos que son liberados al medio de cultivo en forma de vesículas. El estudio de la cadena N-glicosídica de la proteína de parásitos mostró la presencia de una cadena compleja conteniendo ácido siálico, fucosa y gala(1-3)gal. Con el objeto de comparar esta cadena con la de la proteína liberada al medio se separó el mismo, se liofilizó y la glicoproteína Tc-85 fue purificada por cromatografía de afinidad. La misma se desializó y las cadenas N-glicosídicas fueron liberadas con endo N-acetilglucosaminidasa F, marcadas por reducción con  $\text{NaB}^3\text{H}_4$  y purificadas por BioGel P2. El análisis por cromatografía de intercambio aniónico de alta resolución (HPAE-PAD) del producto marcado obtenido, permitió la separación de 3 oligosacáridos (NG1, NG2 y NG3) de tiempos de retención menores que el obtenido de parásitos. La hidrólisis de cada una de las cadenas con diferentes enzimas mostró que: NG1, NG2 y NG3 son sensibles al tratamiento con  $\alpha$ -L-fucosidasa. Sin embargo, mientras que NG2 y NG3 fueron hidrolizadas con  $\alpha$ -manosidasa, sólo NG3 mostró ser sustrato de  $\alpha$ -galactosidasa. Estas observaciones indican que, en el proceso de vesiculación, actuarían ciertas enzimas que modifican las cadenas N-glicosídicas de la proteína. Se han observado anteriormente, también diferencias entre los componentes lipídicos del medio con respecto a los del parásito.

**PR30. Optimización de las condiciones de desenquistamiento in vitro de Cryptosporidium parvum.** B PEZZANI, E BAUTISTA, A CÓRDOBA, MM DE LUCA, JA BASUALDO.

Cátedra de Microbiología y Parasitología, Facultad de Ciencias Médicas, U.N.L.P. 60 y 120 (1900) La Plata

Para evaluar la viabilidad de los ooquistes de *Cryptosporidium parvum*, se desarrolló y optimizó la técnica de desenquistamiento in vitro. Los ooquistes de *C. parvum* utilizados se obtuvieron de una muestra fecal de un niño con criptosporidiosis sintomática. La muestra fue procesada por la técnica de gradiente discontinuo de sucrosa hasta obtener una suspensión de ooquistes purificados y concentrados (OPC). Los

ooquistes se cuantificaron en cámara de Neubauer y preservaron en PBS pH 7,2 a 4°C. Los dos protocolos ensayados a partir de alícuotas de 100µl de OPC con 178.000 ooquistes /mm<sup>3</sup> se mencionan a continuación: I-Tratamiento con bilis 1% y bicarbonato de sodio 0,44% a 37°C durante 24 hs. Grupo A: con pretratamiento con tripsina acidificada pH 2,75 a 37°C durante 1 h. Grupo B: sin pretratamiento con tripsina acidificada. II-Tratamiento con bilis 1% (B) con pH 6 y pH 8, con y sin bicarbonato de sodio al 0,44% (BS) con y sin incubación con 10% de CO<sub>2</sub> durante 24 hs a 37°C. Grupo 1: B pH 6 Grupo 2: B pH 6-BS Grupo 3: B pH 6-BS-CO<sub>2</sub> Grupo 4: B pH 6- CO<sub>2</sub> Grupo 5: B pH 8 Grupo 6: B pH 8-BS Grupo 7: B pH 8-BS-CO<sub>2</sub> Grupo 8: B pH 8- CO<sub>2</sub>. Luego de los procedimientos se evaluó el grado de desenquistamiento en todos los grupos efectuando el conteo de los ooquistes intactos en cámara de Neubauer. Resultados: El recuento en el Grupo A reveló un promedio de 28.000 ooquistes /mm<sup>3</sup> (15,7%) y en el Grupo B 22.000 ooquistes / mm<sup>3</sup> (13 %). Los desenquistamientos fueron del 84 % para el Grupo I y 87 % para el Grupo II. Los porcentajes de desenquistamiento para los Grupos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 y 8 fueron: 49,5%, 83,2%, 88,3%, 56,75%, 92,7%, 83,2%, 88,3%, 94,1% respectivamente. El mayor desenquistamiento se produjo en el Grupo 8 con un conteo de 10.500 ooquistes/mm<sup>3</sup> ( 5,9%) lo que indica una viabilidad superior al 90%. Conclusiones: La preincubación con tripsina no incrementó el desenquistamiento de los ooquistes de *C. parvum*. Las mejores condiciones de desenquistamiento fueron utilizando bilis al 1 % pH 8 incubado con 10% de CO<sub>2</sub> a 37°C durante 24 hs.

**PR31. Microanálisis por EDS/SEM de Trichomonas vaginalis: Experiencia preliminar.** S. R. COSTAMAGNA y M. PRADO FIGUEROA.

Cátedra de Parasitología Clínica. Universidad Nacional del Sur. San Juan 670. (8000). Bahía Blanca. Argentina.

Como parte de estudios que estamos realizando sobre *Trichomonas vaginalis*, es que presentamos este estudio preliminar referido a la presencia de minerales en la superficie del parásito, por microanálisis a través del microscopio electrónico de barrido, a fin de relacionarlos con estudios previos sobre fenómenos de endocitosis, realizados por los autores. Para ello se recolectó secreción vaginal con hisopo estéril de fondo de saco de pacientes con Trichomonosis. Se cultivó dicha muestra en medio líquido de Diamond (Menarini. Cod. Tric. 20. Ref. 1038. Barcelona. España) durante 72 horas a 37 grados centígrados. Posteriormente se concentran los parásitos por centrifugación, fijándose luego los mismos con glutaraldehído al 2% en buffer fosfato 0.05M pH 7.2. Se mantienen en heladera durante 15 días. Luego se efectúan cinco lavados con agua bidestilada estéril, centrifugando a 2000 rpm. 5 min. cada vez. Se metaliza luego el sedimento obtenido y se observa en microscopio electrónico de barrido JEOL 35CF a 12 Kv. Una vez identificado y documentado el flagelado se procede al microanálisis del mismo mediante un analizador EDAX,