

CONFERENCIAS

CONF1. Gliding motility and cell invasion by malaria sporozoites. NUSSENZWEIG, V.

New York University School of Medicine, Department of Pathology, New York, NY 10016, USA. nussev01@popmail.med.nyu.edu.

Plasmodium sporozoites and several Apicomplexa parasites such as Toxoplasma and Cryptosporidium glide on solid substrates. The gliding motility machinery is required for host cell invasion. This type of locomotion does not depend on flagella, cilia or pseudopodia, and its molecular basis is obscure. I will present genetic evidence that the TRAP family of surface proteins propel gliding motility. Cell invasion by Apicomplexa probably involves a capping process triggered by the attachment of the extra-cellular domains of TRAP to the surface of the target cells, and empowered by the interaction of its cytoplasmic tail with parasite motor proteins.

CONF2. Two phylogenetic lineages of *Trypanosoma cruzi*: biochemistry, epidemiology and evolution. ZINGALES B.

Departamento de Bioquímica, Instituto de Química, Universidade de São Paulo, Caixa Postal 26077, 055113-970 São Paulo, SP, Brasil. zingales@iq.usp.br.

A puzzle in Chagas disease research has been to correlate molecular markers with epidemiology since isolates of *Trypanosoma cruzi* exhibit a broad host range, induce distinct clinical presentations in patients and show great diversity in biological and biochemical characteristics. Early studies from Miles and co-workers (1980) on population genetics revealed substantial isozymic variability among isolates of *T. cruzi* defining three major groups or zymodemes named Z1, Z2 and Z3. Further analysis of 15 gene loci disclosed a greater heterogeneity determining the distribution of 121 *T. cruzi* isolates into 43 zymodemes that could not be grouped by Tibayrenc & Ayala (1988) in few natural clusters. The main conclusion of these studies was that the population structure of this parasite is clonal rather than sexual, and, as a consequence, the present genetic and biological variability of *T. cruzi* is resultant from the independent evolution of clonal lines. Indeed the remarkable genetic diversity of *T. cruzi* was confirmed by RFLP of mitochondrial DNA (schizodeme analysis), nuclear DNA fingerprinting and karyotyping studies.

In contrast to the diversity suggested by traditional techniques, PCR amplification of sequences from the 24Sa rRNA gene (LSU) and from the mini-exon intergenic region (ME) indicated a clear dimorphism among *T. cruzi* isolates (Souto & Zingales, 1993; Souto et al., 1996). An examination of approximately 90 *T. cruzi* stocks derived from humans, wild mammals and triatomines from five countries of South America by LSU and ME typing approaches, and RAPD analysis further defined two major parasite lineages with high phylogenetic divergence (Souto et al., 1996). These lineages

have been recently named as groups *T. cruzi* I and *T. cruzi* II (Satellite Meeting, 1999).

Previous studies in different organisms have shown that rRNA promoters exhibit species-specific control. We have examined the activity of the promoter region of the rRNA cistron of a *T. cruzi* II-strain in a plasmid construct bearing this region preceding a reporter gene. Transfection studies indicate that this construct drove the expression of the reporter gene only in epimastigote forms of the homologous *T. cruzi* II group (Floeter-Winter et al., 1997).

To provide evidence of a possible association of epidemiological parameters of *T. cruzi* isolates with the two clearly defined groups, the typing methods were applied to 160 isolates from 12 Brazilian states including four regions where Chagas disease is endemic and the Amazon state, where *T. cruzi* is enzootic (Fernandes et al., 1998; Zingales et al., 1998). Data provide evidence for a strong association of *T. cruzi* II with the domestic cycle (humans and domestic animals) while *T. cruzi* I was preferentially encountered in the sylvatic environment. Since all stocks isolated from seropositive individuals from endemic regions were *T. cruzi* II, we suggested that this group has properties that favor human infections and promote higher parasitemia. On the other hand, in Amazonas, *T. cruzi* I was isolated from triatomines and very few human seropositive individuals who presented low parasitemia and the indeterminate form of Chagas disease (Zingales et al., 1998). Analysis of parasite stocks from endemic areas in Bolivia and Colombia confirm the above conclusions concerning the epidemiological distribution of the two *T. cruzi* groups (unpublished observations).

We have also analyzed parasite stocks from mammals and triatomines of the Atlantic Coast rainforest in the State of Rio de Janeiro. Data indicate the preferential adaptation of *T. cruzi* II to primates and *T. cruzi* I to opossums (Fernandes et al., 1999), as has also been concluded from studies conducted in the state of Georgia (USA) (Pung et al., 1998).

Comparative sequence analysis of the variable region D7 of LSU rRNA gene indicated that the divergence between the two *T. cruzi* groups occurred before the divergence of the extant strains (Briones et al., 1999). Phylogenetic reconstructions using sequences of the SSU genes indicate that the divergence between the two groups is greater than the distances separating four species of *Leishmania*, and comparable to distances among trypanosomatid genera *Crithidia*, *Leishmania*, *Endotrypanum* and *Leptomonas*. Using patristic distances of the maximum likelihood tree and evolutionary rates of 0.85% sequence divergence/100 million years and 2% sequence divergence/100 million years we estimate the divergence time of the two *T. cruzi* groups to be 88 to 37 million years, respectively, and place their separation between the Oligocene (Cenozoic) and the end of Cretaceous (Mesozoic) (Briones et al., 1999).

The collection of data indicate that the two *T. cruzi* groups have evolved independently for a long period and have dis-

tinct epidemiological, ecological and biochemical attributes. These criteria could be sufficient to propose a status of taxonomic species to each group.

References

- Briones MRS, Souto RP, Stolf BS, Zingales B (1999) *Mol Biochem Parasitol* 104: 219-295.
- Fernandes O, Souto RP, Castro JA, Pereira JB, Fernandes NC, Junqueira ACV, Naiff RD, Barret TV, Degrave W, Zingales B, Campbell DA, Coura JR (1998) *Am J Trop Med Hyg* 58: 807-811. Fernandes O, Mangia RH, Lisboa CV, Pinho AP, Morel CM, Zingales B, Campbell DA, Jansen AM (1999) *Parasitology* 118: 161-166.
- Floeter-Winter LM, Souto RP, Stolf BS, Zingales B, Buck GA (1997) *Exp Parasitol* 86: 232-234.
- Miles MA, Lanham SM, De Souza AA, Póvoa, M (1980) *Trans R Soc Trop Med and Hyg* 74: 221-242.
- Pung OJ, Spratt J, Clark CG, Norton TM, Carter J (1998) *Zoo Wildl Med* 29: 25-30.
- Satellite Meeting (1999) *Mem Inst Oswaldo Cruz* 94: 429-432.
- Souto RP, Zingales B (1993) *Mol Biochem Parasitol* 62: 45-52
- Souto, RP, Fernandes, O, Macedo, AM, Campbell, DA & Zingales, B (1996) *Mol Biochem Parasitol* 83: 141-152.
- Tibayrenc M, Ayala, F (1988) *Evolution* 42: 277- 292.
- Zingales B, Souto RP, Mangia RH, Lisboa CV, Campbell DA, Coura JR, Jansen A, Fernandes O (1998) *Int J Parasitol* 28: 105-112.

Financial Support: CNPq and FAPESP

CONF3. The acidocalcisome as a potential target for antiparasitic drugs. DOCAMPO R AND MORENO SNJ.

Laboratory of Molecular Parasitology, Department of Pathobiology, University of Illinois at Urbana-Champaign, Urbana, IL 61802-6178, USA.

Vacuolar H⁺-pyrophosphatases (V-H⁺-PPases) had, until recently, been found mainly in vacuoles of plants, ranging from the unicellular alga *Acetabularia* to higher plants. The known range of organisms possessing V-H⁺-PPases was recently greatly expanded by our discovery of this activity in trypanosomatids and Apicomplexan parasites. Our results showed that much of the activity was associated with a vesicle rich in calcium, magnesium, phosphorus, and sodium, which we had previously identified as the acidocalcisome and that is similar to what was described in different microorganisms at the beginning of last century as volutin granules. Acidocalcisomes have been purified from different trypanosomatids and shown to contain different pumps (V-H⁺-PPase, V-H⁺-ATPase, Ca²⁺-ATPase) and exchangers (Na⁺/H⁺, Ca²⁺/H⁺). The genes encoding for these pumps and exchangers have been or are being cloned, sequenced and expressed and affinity purified antibodies used to localize them to the acidocalcisomes. Acidocalcisomes have also been demonstrated to contain pyrophosphate and short and long chain polyphosphates.

Pyrophosphate analogs (bisphosphonates) have been shown to be effective antiparasitic drugs possibly by accumulating in these organelles. The absence of these organelles in the mammalian hosts and their presence in different microorganisms provides an ideal target for the development of new drugs.

CONF4. Sequencing the genome of *Trypanosoma cruzi*. TAMMI M, EDWARDS K, ÖNCÜ D, DARBAN H, ÅSLUND L, PETTERSSON U, ANDERSSON B.

Department of Genetics and Pathology, Rudbeck Laboratory, Uppsala, Sweden, bjorn.andersson@genpat.uu.se.

The primitive protozoan parasite *Trypanosoma cruzi* causes Chaga's disease, which affects 16-18 million people in South- and Central America. These organisms show several unique characteristics, such as extensive chromosome size variation, trans-splicing of mRNA from polycistronic pre-messages and large clusters of tandemly repeated genes. Massive mapping and sequencing of the *T. cruzi* genome will be carried out during the next three to five years with the help of funding from the NIH. This will be carried out in our laboratory and at TIGR and the SBRI. The strategy will be to use a clone by clone approach and mapping using BAC-end sequencing, resulting in the sequence of most of the *T. cruzi* genome. We have as a pilot project sequenced the third smallest chromosome of the CL Brener strain of *T. cruzi*, and we are currently performing the final analysis of the 620 kb chromosome and its 1 Mb homologue. The gene density has been found to be approximately one per four kb. The majority of genes identified are of unknown function, but a number of genes with homology to known genes in parasites and other organisms have been identified along with several known and novel repeat elements. The majority of genes are organized as one longer and one shorter region, where they are transcribed on the same strand away from a "strand-switch" region. An abundance of repeated regions has been found, including *T. cruzi* repeat elements, members of large gene families, and five tandemly repeated gene loci, each containing up to 50 copies of a gene. Both telomeric regions contain tandemly repeated surface antigen family members as well as other repeat elements and other genes belonging to a dispersed gene family. Strategies and software for the analysis of such regions will be presented. The homologue contains a region of several hundred kb that is not present in chromosome 3. This, coupled with an unusually high sequence diversity consisting of approximately one base difference per 50 bp and occasional short insertions/deletions, indicates that these chromosomes have evolved independently for a long time. The sequence of chromosome 3 has provided information on the complexity of the *T. cruzi* genome that will be useful for the continuation of this genome project.

CONF5. Cell biology of the *Toxoplasma gondii*-host cell interaction. DUBREMETZ JF.

Institut de Biologie, Lille, France, jean-francois.dubremetz@ibl.fr.

A major issue in *Toxoplasma gondii* development is host cell invasion, since this protozoan, like many apicomplexans, is an obligate intracellular parasite. The tachyzoite, which is the invasive stage upon the acute phase of the disease, is a convenient model for studying parasite host cell interaction because it can be grown easily and in large amounts in cell cultures in vitro. In addition, it can now be genetically transformed, and stable, well defined mutants, can be obtained and propagated.

The invasive stage is a highly differentiated cell containing 3 sets of secretory organelles that are involved in cell

invasion. These organelles are named respectively micronemes, rhoptries and dense granules. Their precise role is not completely defined yet, and this is a field of intense investigation in several Apicomplexa, since these organelles are shared by all apicomplexan invasive stages and are likely to be involved in invasion by all members of the phylum. Therefore, in most cases, what is found in one genus will generally hold true through the phylum. Invasion is an active process that depends upon the actin-myosin driven gliding motility of the tachyzoite. The parasite induces the development of a vacuole that is partly derived from the host cell plasmalemma and it glides inside this vacuole until being fully internalized. The whole process takes a few seconds. The parasite then develops in the parasitophorous vacuole that never fuses with the other vesicular compartments of the host cell. Micronemes, rhoptries and dense granules are involved in invasion sequentially in this order.

Micronemes are exocytosed first, upon apical contact between parasite and host cell. They contain a set of adhesins that are likely to mediate the binding between parasite and host-cell membrane during the internalisation process. Some transmembrane microneme proteins are believed to be responsible for gliding motility in bridging the subpellicular actin-myosin motor and soluble adhesive proteins on the parasite surface. Microneme adhesins are secretory proteins that contain domains with homologies to binding domains of higher eukaryotes receptors such as thrombospondin, epidermal growth factor, lectins, etc. Some of them such as MIC1, 3 and 4 are likely to act as bridges between the parasite and the host-cell surfaces. The trafficking of microneme proteins during the biogenesis of the organelles seems to be driven by specific domains in the cytosol oriented Cterminus of microneme transmembrane proteins, that are responsible for the specific targeting to the organelle. Soluble microneme protein targeting seems to rely upon association with transmembrane proteins into heteromeric complexes that may persist after exocytosis to the surface to be involved in host cell binding. The MIC1,4,6 complex is a likely candidate for such a functional association. Deletion of the genes coding for these 3 microneme proteins have allowed the analysis of the part played by each of the components of this complex in microneme targeting. Rhoptries are exocytosed during the formation of the parasitophorous vacuole and the simultaneous parasite internalization. Whereas microneme proteins are excluded from the vacuole and stay outside of the cell while the parasite invades, the major rhoptry proteins known so far are found associated with the vacuolar membrane as soon as this one starts developing. The role of rhoptry proteins in invasion remains obscure, and most of the sequences that have been determined for rhoptry proteins have no homology to any known proteins. Much work remains to be done to characterize rhoptry contents, especially enzymatic activities such as proteases or phospholipases that have long been suggested to be present in these organelles and to play a role in invasion, but have not been characterised so far.

Dense granule exocytosis occurs after internalization and is likely to mature the vacuole into a metabolically active compartment enabling exchanges between parasite and host cell, most likely through pores in the vacuole membrane that would allow for the free trafficking of metabolites. Although numerous dense granules proteins have been characterized and some of them shown to become associated with the parasitophorous vacuole membrane with a transmembrane topology, none has been shown so far to be responsible

for pore formation. Despite considerable progresses in the last years, much remains to be done to understand the complex and fascinating process of host cell invasion by *T. gondii* and other Apicomplexan zoites. The increasing amount of data brought by systematic sequencing and comparisons between apicomplexans, together with genetic transformation, should speed up progresses in the field in the near future.

CONF6. Life beyond death: apoptotic bodies promote the growth of *Trypanosoma cruzi* within macrophages. DOS REIS GA, FREIRE-DE-LIMA CG, AND LOPES MF.

Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, BRASIL. gdosreis@biof.ufrj.br.

Experimental Chagas disease, induced in mice by infection with *Trypanosoma cruzi*, is characterized by intense lymphocyte apoptosis in the acute phase¹. Apoptotic cells display a set of surface markers named ACAMPs, for apoptotic cell-associated molecular patterns². Professional phagocytes express a set of pattern recognition receptors complementary to ACAMPs, that allows for rapid and non-inflammatory clearance of apoptotic cells³. One major ACAMP receptor is the Vitronectin Receptor (VNR or α V β 3 integrin), that binds apoptotic cells opsonized by the extracellular matrix protein thrombospondin³. Instead of being neutral, uptake of apoptotic neutrophils by human macrophages induces secretion of anti-inflammatory mediators, such as prostaglandins, platelet-activating factor (PAF), and transforming-growth factor beta (TGF- β)⁴. Previously, we found that the onset of Fas-mediated T-lymphocyte apoptosis exacerbates the production of trypomastigote forms of *T. cruzi* by co-cultured macrophages⁵. We investigated a possible connection between uptake of apoptotic bodies, TGF- β secretion and the growth of *T. cruzi* within infected macrophages.

Apoptotic, but not necrotic T cells, increased parasitemia *in vivo*, and increased the growth of *T. cruzi* in peritoneal macrophages⁶. The effect was dependent on VNR engagement, as assessed with a monovalent Fab fragment of an anti-VNR monoclonal antibody (mAb H9.2B8). Interestingly, the intact anti-VNR mAb mimicked the helper effect of apoptotic cells on *T. cruzi* growth⁶. Both apoptotic cells and intact anti-VNR mAb induced PGE₂ synthesis and TGF- β secretion by macrophages, while cyclooxygenase inhibitors (aspirin, indomethacin) and a neutralizing anti-TGF- β antibody blocked the growth of *T. cruzi*⁶. Apoptotic cells also blocked nitric oxide production induced by LPS plus IFN- γ , an effect mediated by VNR engagement and TGF- β secretion⁶.

Growth of *T. cruzi* driven by apoptotic bodies showed a delayed kinetics, with an exponential surge after 7 days in culture. We found that both apoptotic cells and VNR engagement induced *de novo* Ornithine Decarboxylase (ODC) activity in macrophages, with identical delayed kinetics⁶. Induction of ODC activity was dependent on TGF- β production⁶. ODC drives polyamine (putrescine, spermine, spermidine) production from arginine and ornithine. We reasoned that apoptotic cells induce polyamine accumulation in macrophages, and that *T. cruzi* uses polyamines to increase its replication. Apoptotic, but not necrotic T cells, induced putrescine accumulation in macrophages, and exogenous putrescine increased *T. cruzi* replication. Moreover, α -methyl ornithine, an irreversible ODC blocker, completely blocked the growth of *T. cruzi* driven by apoptotic cells, without affecting basal parasite replication. Injection of cyclooxygenase inhibitors,

such as aspirin and indomethacin during the first week of infection (with Dm28c *T. cruzi* clone), reduced subsequent parasitemia by 90%⁶. Taken together, these results characterize a novel biochemical pathway linking the uptake of apoptotic cells to TGF- β secretion and polyamine production. Conceivably, this pathway could be involved in tissue repair. Our *in vivo* results suggest that this pathway might have pathogenic relevance. By inducing lymphocyte apoptosis, the parasite could take advantage of this pathway to promote its own replication.

Both dendritic cells and macrophages are able to take up apoptotic and necrotic cells, although they ingest apoptotic cells through different sets of ACAMP receptors⁷. While dendritic cells present apoptotic cell antigens to T cells, macrophages, on the other hand, appear to suppress such potentially dangerous immune responses for the sake of tissue integrity⁷. Perhaps other pathogens, besides *T. cruzi*, could take advantage of the macrophage's permissive intracellular milieu created by apoptotic cells⁷. The VNR/TGF- β /ODC/polyamine growth pathway identified suggests the use of several known pharmacological blockers, and the development of new drugs against *T. cruzi* infection. We have also proposed that this pathway could be involved in the link between drug- and radiation-induced apoptosis, and reactivation of chronic *T. cruzi* infection in immunocompromised hosts⁸. New *in vitro* and *in vivo* models of infection in transgenic and gene knock out mice will help investigating these issues.

References:

1. Lopes, M.F., Veiga, V.F., Santos, A.R., Fonseca, M.E.F., and DosReis, G.A. (1995). Activation-induced CD4+ T cell death by apoptosis in experimental Chagas' disease. *J. Immunol.* 154; 744-752.
2. Franc, N.C., White, K., and Ezekowitz, R.A.B. (1999). Phagocytosis and development: back to the future. *Curr. Opin. Immunol.* 11; 47-52.
3. Savill, J. (1998). Phagocytic docking without shocking. *Nature* 392; 442-443.
4. Fadok, V.A., Bratton, D.L., Konowal, A., Freed, P.W., Westcott, J.Y., and Henson, P.M. (1998). Macrophages that have ingested apoptotic cells *in vitro* inhibit proinflammatory cytokine production through autocrine/paracrine mechanisms involving TGF- β , PGE-2 and PAF. *J. Clin. Invest.* 101; 890-898.
5. Nunes, M.P., Andrade, R.M., Lopes, M.F., and DosReis, G.A. (1998). Activation-induced T-cell death exacerbates *Trypanosoma cruzi* replication in macrophages cocultured with CD4+ T lymphocytes from infected hosts. *J. Immunol.* 160; 1313-1319.
6. Freire-de-Lima, C.G., Nascimento, D.O., Soares, M.B.P., Bozza, P.T., Castro-Faria-Neto, H.C., de Mello F.G., DosReis, G.A., and Lopes, M.F. (2000). Uptake of apoptotic cells drives the growth of a pathogenic trypanosome in macrophages. *Nature* 403; 199-203.
7. Lopes, M.F., Freire-de-Lima, C.G., and DosReis, G.A. (2000). The macrophage haunted by cell ghosts: a pathogen grows. *Immunol. Today (Viewpoint).* 21; 000-000. In press.
8. Lopes, M.F., and DosReis, G.A. (2000). Experimental Chagas disease: phagocytosis of apoptotic lymphocytes deactivates macrophages and fuels parasite growth. *Apoptosis* 5; 221-224.

Work supported by the following Brazilian agencies: FAPERJ, PRONEX-MCT, and PADCT/World Bank/CNPq.

CONF7. Trypanosomatid Glycolysis and Drug Target Selection. OPPERDOES F.

Research Unit for Tropical diseases and Laboratory of Biochemistry, Christian de Duve Institute of Cellular Pathology and Université Catholique de Louvain, B-1200 Brussels, Belgium. opperdoes@trop.ucl.ac.be.

Glycolysis is the only ATP-generating process in bloodstream-form trypanosomes and therefore a promising drug target. Inhibitors which significantly decrease the glycolytic flux will kill the parasites. Both computer simulation and experimental studies of glycolysis in bloodstream-form *Trypanosoma brucei* indicated that control of the glycolytic flux is shared by several steps in the pathway. The results of these analyses provide quantitative information about the prospects of decreasing the flux by inhibition of any individual enzyme. The plasma-membrane glucose transporter appears the most promising target from this perspective, followed by aldolase, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, phosphoglycerate kinase and glycerol-3-phosphate dehydrogenase. Non-competitive or irreversible inhibitors will be most effective, but it is argued that potent competitive inhibitors can be suitable, provided that the concentration of the competing substrate cannot increase unrestrictedly. Such is the case for inhibitors that compete with coenzymes or with blood glucose. An example, using NAD analogues as specific inhibitors of the glycosomal enzyme glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and inhibiting the enzyme at sub micromolar concentrations and affecting the viability of both extracellular and intracellular trypanosomatids at low micromolar concentrations, will be presented.

CONF8. Diagnóstico de fasciolosis humana y animal. DUMÉNIGO RIPOLL BE.

Departamento de Parasitología, Instituto "Pedro Kouri", Ciudad de La Habana, Cuba.

Se describe la utilización de un sandwich ELISA (sandwich ELISA ES78) para la detección de antígenos circulantes y coproantígenos mediante un anticuerpo monoclonal, en el diagnóstico de humanos y animales infectados con *Fasciola hepatica* desarrollado en el Instituto "Pedro Kouri". Se compara con el examen coproparasitológico y la detección de anticuerpos. La detección de coproantígenos demostró ser superior a los otros métodos empleados en el diagnóstico de la infección activa en todas sus fases con una especificidad del 100% y 99% y una sensibilidad del 94.9% y 97% en humanos y bovinos respectivamente así como en el seguimiento terapéutico en pacientes y en ovinos experimentalmente infectados. En países como Cuba, enzooticos de fasciolosis hepática, con gran número de casos humanos esporádicos y con ocurrencia de brotes epidémicos la detección de coproantígenos por el sandwich ELISA ES78 sería la técnica de elección para el diagnóstico de fasciolosis humana y animal.

CONF9. Inmunoprotección en Hidatidosis. JENSEN O.

Programa de Control de la Hidatidosis, Chacra 18, Sarmiento, Chubut. Argentina. hidatidosis@coopsar.com.ar.

La Hidatidosis es una enfermedad del grupo de las zoonosis transmisibles de los animales al hombre. En la Patagonia Argentina, constituye un serio problema socio-económico, que afecta la salud de sus habitantes y deteriora la producción ganadera. Sus programas de control intentan desestabilizar el ciclo de la enfermedad, mediante la desparasitación periódica de los perros y la educación sanitaria.

Es una enfermedad erradicable. Desde 1.853 se conoce el ciclo del parásito, desde 1.864 se realiza educación sanitaria y control de faena, desde 1.890 se utiliza el tenífugo bromhidrato de arecolina y desde 1975 disponemos del tenicida praziquantel. Con la educación sanitaria, el control de faena y la desparasitación canina, teniendo al perro como actor principal, solo en Islandia se logró la erradicación y en Tasmania y Nueva Zelanda, se está en el proceso de declararse libres de hidatidosis. La posibilidad de incorporar nuevas acciones en la línea ovina, permitirán atacar al ciclo de la enfermedad hidatídica en un nuevo frente y así disminuir el tiempo en lograr el control.

Los trabajos de investigación relacionados al desarrollo de una vacuna para lograr la inmunización de ovinos contra la infección por *Echinococcus granulosus* abren una nueva perspectiva para los programas de control. Una efectiva vacuna contra la infección por *E. granulosus* será un arma de gran utilidad. El Laboratorio de Parasitología Molecular de la Universidad de Melbourne, Australia, el AgResearch de Nueva Zelanda y el programa de control de la Hidatidosis del Chubut, evalúan la vacuna experimental EG95.

El programa de control de la Hidatidosis de la provincia del Chubut, es un subprograma de la Dirección de Control de Patologías Prevalentes, inserto en el Plan de Salud de la Subsecretaría de Salud. Su objetivo es reducir el riesgo de enfermar de los habitantes, atacando el ciclo de la enfermedad a través de la educación sanitaria de la población y las desparasitaciones caninas periódicas con un tenicida. La vacuna experimental que protege a los ovinos contra infecciones repetitivas por *E. granulosus* está basada en un clonado de antígeno recombinante definido, designado EG95, a partir de huevos del parásito. Es una preparación proteica purificada, no infecciosa, no tóxica, no contaminante y producida mediante ingeniería genética. La vacuna es administrada en forma subcutánea, a la dosis de 50 µg de proteína EG95 y 1 mg de adyuvante Quil A, en un volumen de 2 ml. Finalizaron las experiencias que utilizaron la vacuna experimental denominada EG95, en Nueva Zelanda, Australia y China; a distintas dosis y tiempos de desafío, lográndose protecciones del 83 %, 96%, 97% y 100 % en Nueva Zelanda, del 83 y 96 % en Australia y del 90% y 97 % en China.

En Argentina finalizaron cinco ensayos. El ensayo Chubut Nº 1, se inicia en Mayo de 1995, con 20 corderos Merino. Diez fueron protegidos con dos dosis de vacuna EG95 con 4 semanas entre ambas. Todos fueron desafiados con aproximadamente 2.000 huevos de *E. granulosus* a las 4 semanas. Después de 14 meses de producida la infección, todos los ovinos que finalizaron la prueba, (7 del grupo vacunado y 10 testigos), fueron sacrificados, bajo condiciones que permitieron el examen detallado de la res y de las vísceras, especialmente el hígado, los pulmones, los riñones, el bazo y el cerebro, que se cortaron en trozos de 1 a 2 mm, en búsqueda de quistes hidatídicos. En el grupo testigo, en todos los animales (10/10), se encontraron quistes hidatídicos. Fueron detectados en total 232 quistes hidatídicos. En el grupo vacunado, en un ovino (1/7), se encontró un (1) quiste hidatídico viable, de 2 mm. La protección estimada fue del 99.4%.

El ensayo Chubut Nº 2, se inicia en Mayo de 1996, en condiciones de campo, en un establecimiento de 2.500 ha. La prueba se inicia con 20 corderos Merinos, de 6 meses de edad, divididos al azar en dos grupos identificados con caravana color verde y amarillo. El grupo verde fue protegido con tres dosis de vacuna EG95. Todos fueron desa-

fiados (infección experimental), vía oral, con aproximadamente 2.000 huevos de *E. granulosus*. En los cinco ovinos que finalizaron la prueba del grupo testigo se encontraron quistes hidatídicos, que en total sumaron 464. En el grupo vacunado no se encontraron quistes. La protección estimada fue del 100%. El ensayo Chubut Nº 3, se inicia en Abril de 1997, con 90 corderos, raza Corriedale, de 6 meses de edad, a fin de evaluar número de dosis y tiempo de protección. Fueron caravaneados y divididos al azar en tres grupos. Sesenta corderos fueron protegidos con una dosis de vacuna EG95 y treinta recibieron una segunda dosis a los 45 días, quedando los restantes como testigos. Se realizaron desafíos en distintos grupos y fechas, efectuándose hasta la fecha las necropsias de 50 animales. Quedan en la experiencia 40 animales, que serán estudiados serológicamente a fin de seguir los niveles de anticuerpos logrados, en los próximos tres años. En los animales testigos examinados (17 ovinos) se encontraron 3.728 quistes viables con una media de 219 quistes por animal. Con una sola dosis de la vacuna experimental EG95 se examinaron 13 ovinos y se logró una protección del 85 % para la infección artificial con *E. granulosus* a los 3 meses de la última dosis y del 82% a los 12 meses. Con dos dosis de vacuna se examinaron 11 animales, estimándose una protección del 99 % para 4 meses y del 98% para 11 meses post vacuna.

El ensayo Chubut Nº 4, se inició en Mayo del 97, en un lote de 10 Ovejas raza Texel, servidas en el otoño, las que fueron protegidas con dos dosis de vacuna EG95 y fueron desafiados sus corderos con *E. granulosus*, para evaluar la transferencia calostrual (madre - hijo) de inmunidad. La protección estimada en los corderos fue del 98% hasta los 40 días de vida.

El ensayo Chubut Nº 5, se inicia en la primavera de 1.999 con tres ovejas Texel previamente vacunadas y tres de sus corderos y dos corderos hijos de madres no vacunadas. Todos los corderos fueron vacunados. Por un ensayo K-Elisa se evaluaron los sueros para determinar los niveles de actividad anticuerpo y por un ensayo inmunoblot los sueros y el calostro para revelar actividad anti-EG95. La inmunidad calostrual no interfirió con la respuesta de anticuerpos en los corderos vacunados.

La vacuna experimental EG95 logra un elevado nivel de protección ante la infección por *E. granulosus*, estimada en: superior al 82% con una dosis, superior al 97 % con dos dosis y del 100% con tres dosis. Argentina posee más de 60.000.000 millones de huéspedes intermediarios del sector ganadero y 13.000.000 de ovinos, susceptibles de contraer la enfermedad hidatídica y potenciales receptores de la vacuna.

La vacuna, debería permitir inmunizar a animales de corta edad mientras aún están protegidos por los anticuerpos que recibieron de su madre, y mantener los niveles protectivos con un refuerzo anual administrado a las madres en los trabajos previos a la parición y al resto de la majada en la esquila.

La disponibilidad de una vacuna contra Hidatidosis ovina:

Permitirá al Programa de Control disminuir el tiempo en controlar la Hidatidosis en su territorio, al poder atacar el ciclo de la enfermedad en un nuevo frente, acentuando la reducción de la oferta de quiste hidatídicos disponibles para los perros y ayudando a disminuir el riesgo de enfermar de las personas.

Ofrecerá al productor ovino una nueva alternativa, que deberá sumar a las hoy disponibles, como la desparasitación

canina, la educación sanitaria y el control de faenamiento, para erradicar la Hidatidosis de su establecimiento.

Bibliografía

- Lightowers MW, Flisser A, Gauci CG, Heath DD, Jensen O, and Rolfe R, Vaccination Against Cisticercosis and Hydatid Disease (2000) *Parasitology Today* 179, 191-196
- Lightowers Marshall W. Infecciones por Echinococcus: Aspectos inmunobiológicos y de vacunación. (1994) *Organización Panamericana de la Salud*. Organización Mundial de la Salud. pp 1-21.
- Programa de Control de la Hidatidosis (1993). En: *Plan de Salud*. Sistema Provincial de Salud. Ministerio de Salud y Acción Social. Provincia del Chubut. pp 15-17.
- Jensen O., Fernández R., Gonzalo R., Fernández E., Iriarte J., Lago J. Perspectivas de los Programas de Hidatidosis a través del Control de la enfermedad en el Ovino. (1995) *Boletín de Hidatidosis de la Provincia del Chubut*, 3: 17-18.

CONF10. Protist core metabolism: diversity and evolution. MÜLLER M.

*The Rockefeller University, New York, NY 10021, USA.
mmuller@rockvax.rockefeller.edu.*

While core energy metabolism of prokaryotes reveals an enormous diversity, this process is much more conservative in eukaryotes. Studies on a limited number of unicellular eukaryotes, protists, disclosed, however, an impressive array of different types of enzymatic and subcellular organization of core metabolism. This presentation aims at highlighting this diversity and commenting on its origins by comparing the core metabolism of *Giardia lamblia*, *Entamoeba histolytica*, *Mastigamoeba balamuthi*, *Trichomonas vaginalis* and *Trypanosoma brucei* to that of typical mitochondriate eukaryotes. Emphasis will be placed on two parts of carbohydrate catabolism, glycolysis proper [conversion of carbohydrates to phosphoenolpyruvate (PEP) and pyruvate (PYR)] and its extensions leading to the formation of the major metabolic end products. The basic nature of the first is highly conserved in all eukaryotes (Embden-Meyerhof-Parnas glycolysis). The dominant part of diversity is seen in the second part.

While the overall metabolic maps depicting the conversion of hexoses into organic end products can be easily superimposed for all organisms discussed, biochemical, cell biological and molecular studies reveal marked diversity. Regarding individual steps of metabolism: (a) enzymes performing a given metabolic conversion can be homologs but differ in their evolutionary history; (b) enzymes performing a given metabolic conversion can differ in the mechanism of the reaction catalyzed; (c) enzymes acting on a given intermediate can produce different products; (d) enzymes catalyzing certain reactions can be absent from some of the organisms.

Diversity of the subcellular organization is, however, the aspect that dominates the metabolic diversity of protists. Kinetoplastids have a canonical organization of eukaryotes with their core metabolism taking place in three compartments, cytosol, mitochondrion and peroxisomes. Concerning glycolysis proper, however, they represent a unique picture with several enzymes of the initial steps of this pathway sequestered in the glycosomes, organelles akin to peroxisomes. In contrast, the other organisms discussed do not harbor a typical mitochondrion containing cytochromes and cytochrome oxidase and are functionally amitochondriate. Their mechanism of oxidation of pyruvate to acetyl-CoA also separates

them from organisms with typical mitochondria. They contain pyruvate:ferredoxin oxidoreductase, an iron-sulfur protein, instead of the multienzyme pyruvate dehydrogenase complex. This enzyme is localized either in a double-membrane bounded organelle, the hydrogenosome (Type II amitochondriates, e.g. *T. vaginalis*) or in the cytosol (Type I amitochondriates, e.g. the rest of the species listed above).

The origin of this metabolic diversity remains to be elucidated. Increasing evidence indicates that all eukaryotes derive from a single ancestor that arose from a symbiotic event between a eubacterium and an archaeobacterium. The eubacterial component gave rise to a double-membrane bounded organelle, the ancestor of mitochondria. All organisms so far studied, whether they contain typical mitochondria or not, show evidence of having harbored the ancestor of this organelle in their evolutionary past. Much of the metabolic machinery of the eukaryotic cell is assumed to originate from the ancestral mitochondrion, but with a significant contribution from horizontal gene transfers. A reconstruction of this history will require a marked extension of the enzymatic and taxonomic database.

The descendants of the ancestral organelle are the mitochondrion and hydrogenosome, organelles with a key role in core metabolism and the mitosome (crypton), an organelle detected in *E. histolytica* that probably has lost such functions. It is possible that in some groups (*Giardia*) the organelle as a morphological entity got lost completely. The evolutionary steps connecting these derivatives of the ancestral organelle remain enigmatic but seem to represent «evolution by losses of function,» as proposed by André Lwoff in 1944.

CONF11. The Endocytic Pathway in Parasitic Protozoa.

DE SOUZA W, PORTO CARREIRO I, MIRANDA K, UEDA-NAKAMURA T, LANFREDI-RANGEL A, ATTIAS M and CUNHA E SILVA N.

*Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro.
wsouza@biof.ufrj.br.*

Most of the pathogenic protozoa do not present organelles involved in the storage of metabolic products. Their nutrition takes place both through the direct transport of single molecules across the plasma membrane or through a process of endocytosis. This latter process will be reviewed here for a few pathogenic protozoa.

The flagellar pocket of trypanosomatids. All trypanosomatids present a region, known as the flagellar pocket, formed by an invagination of the plasma membrane, in direct continuity with the membrane of the flagellum. Due to the fact that the membranes lining the cell body and the flagellum establish a physical contact between them at the point of emergence of the flagellum, the pocket can be considered as a special extracellular compartment, in some way isolated from the extracellular medium. There are several evidences showing that the flagellar pocket is a highly specialized region of the surface of trypanosomatids where intense endocytic and exocytic activity takes place.

The epimastigote stage of *T. cruzi* possesses a highly specialized structure known as the cytostome-cytopharynx complex. It appears as a funnel-shaped structure formed by a deep invagination of the plasma membrane which may reach the nuclear region. Freeze-fracture studies have shown that this area is limited from the other portions of the plasma membrane by a pallisade-like array of closely associated particles. The specialized region presents very few

intramembranous particles, as seen in freeze-fracture replicas¹. However, its surface is very rugous, as observed in fracture-flip replicas which shows the actual surface of the membrane lining the cytostome². It has been shown that when epimastigotes are incubated in the presence of gold-labeled macromolecules such as transferrin, LDL, etc., they initially bind to the cytostome region and then are internalized via endocytic vesicles which are formed at the bottom of the cytopharynx³. Recent morphometric studies have shown that in the case of epimastigote forms of *T. cruzi* about 85-95 % of the gold particles seen were associated to the cytostome⁴ rather than to the flagellar pocket, as occurs with *T. brucei*. This observation makes *T. cruzi* the cell presenting the most polarized system of endocytic activity so far described. Following binding to the cytostome, macromolecules are rapidly internalized via the cytopharynx and appear in small endocytic vesicles which bud from the deepest region of this structure. Subsequently, these vesicles fuse to each other to form tubular structures which can be observed from in the most central portion to the posterior end of the protozoan. Later on, the macromolecules are concentrated in structures known as the reservosome. Each epimastigote form presents several reservosomes, mainly localized in the posterior region of the cell. Most of the endocytic compartments of *T. cruzi* are acidic, as indicated by labeling with acridine orange, a fluorescent probe widely used to monitor pH gradients across membranes. Labeling of the tubular intermediate compartment and of the reservosomes was observed⁴. The determination of the pH of the organelle using the DAMP technique indicated a value of pH 6.0 thus suggesting that the reservosome corresponds to a pre-lysosomal compartment⁵. No acid phosphatase activity can be systematically detected in the organelle⁵. One characteristic feature of the reservosome in *T. cruzi* is to accumulate a large amount of cruzipain, the major cysteine proteinase found in the cell. A fraction containing the reservosomes of epimastigote forms of *T. cruzi* was obtained using the cell fractionation technique and its biochemical composition was determined.

Other structures which will be analyzed include the megasomes, found in amastigote forms of *Leishmania* of the mexicana complex. It is an acidic organelle which also concentrates cysteine proteinases. The biogenesis of the organelle was followed during the process of transformation of promastigote into amastigote forms of *Leishmania amazonensis*⁶. Another interesting structure is the system of peripheral vesicles found in trophozoites of *Giardia lamblia*. Cytochemical studies have shown that the vacuoles constitute a unique system where early endosomes, late endosomes and lysosomes are concentrated in the same organelle⁷.

References

1. De Souza, W., Martinez-Palomo, A., Gonzales-Robles, A. (1978): The cell surface of *Trypanosoma cruzi*. Cytochemistry and freeze-fracture. *J. Cell Sci.* 33, 285-299.
 2. Pimenta et al. (1989) The cell surface of *Trypanosoma cruzi*: a fracture-flip, replica-staining label-fracture survey. *Eur. J. Cell Biol.* 50, 263-271.
 3. Soares et al. (1992) Identification of a large pre-lysosomal compartment in the pathogenic protozoan *Trypanosoma cruzi*. *J. Cell Sci.* 102, 157-167.
 4. Porto Carreiro et al. (2000). *Trypanosoma cruzi* epimastigotes endocytic pathway: cargo enters the cytostome and passes through an early endosomal network before reservome storage. *Eur. J. Cell Biol.*, in press.
 5. Soares & De Souza (1991): Endocytosis of gold-labeled proteins and LDL by *Trypanosoma cruzi*. *Parasitol. Res.* 77, 461-468.
 6. Ueda-Nakamura et al. (2000). Megasome biogenesis in *Leishmania amazonensis*: a morphometric and cytochemical study. *Parasitol. Res.* in press
 7. Lanfredi-Rangel et al. (1998). The peripheral Vesicles of Trophozoites of the Primitive Protozoan *Giardia lamblia* may correspond to early and late endosomes and to lysosomes. *J. of Struct. Biol.* 1-12
- Supported by PRONEX, CNPq, FINEP and FAPERJ.

MESAS REDONDAS

MR1: Respuesta inmune en la infección por tripanosomátidos

MR1. Differential contribution of Th1/Th2 cytokine environments to resistance to infection with *Trypanosoma brucei* and *Trypanosoma congolense*. NOËL W, NAMANGALA B, BRYN L, DE BAETSSELIER P AND BESCHIN ALAIN.

Cellular Immunology Unit, Flemish Interuniversity Institute of Biotechnology, VIB-VUB. St. Genesius Rode, Belgium. winnoel@vub.ac.be.

African trypanosomes are obligate extracellular parasites causing sleeping sickness in humans (*T. brucei*) and 'nagana' disease in cattle (*T. congolense*) in large areas of sub-Saharan Africa. To gain insight into factors governing resistance/susceptibility to these parasites, the immunological responses during *T. brucei* Antat1.1E and *T. congolense* Tc13 infections were compared in different mouse strains. For each parasite, a resistant (low of parasitemia, long

survival) and a susceptible (high parasitemia, short survival) mouse model was established and investigated.

Whereas Balb/c mice were very susceptible to *T. congolense* infections with a mean survival of 8 days, C57/Bl6 mice were relatively resistant and survived over a period of 100 days. Cytokine patterns measured during the early stage of infection showed that *T. congolense*-infected Balb/c had higher levels of type II cytokines (IL-4, IL-13) in lymph node, spleen and plasma as compared to infected C57/bl mice. On the other hand, the levels of type I cytokines (IFN- γ , TNF- α) and NO were comparable in both mouse strains. Interestingly, only C57/Bl6 mice controlled the first peak of parasitemia, while Balb/c mice showed an exponential parasite growth until they died.

In parallel, we compared survival, parasitemia and cytokine profiles in Balb/c and C3H/N mice infected with a *T. brucei* phospholipase C-null mutant (PLC^{-/-}) and its wild type counterpart (WT). In Balb/c mice, a lower first peak of parasitemia was recorded during PLC^{-/-} than during WT infection. Correspondingly, WT-parasites killed these mice within 5 weeks,

whereas PLC^{-/-}-infected mice survived over a period of 10 months. In C3H/N, infection with both the WT- and PLC^{-/-}-parasites induced comparable parasitemias and survival times. During the early stage of infection with both parasites, mostly type I cytokines (IFN- γ , TNF- α) and NO and minimal type II cytokines (IL-4, IL-13, IL-10) were induced in the lymph node, spleen and plasma of Balb/c and C3H/N mice, correlating with their ability to control the first peak of parasitemia. During the late stage of PLC^{-/-} infection, a switch from a type I cytokine to a predominant type II cytokine environment occurred in Balb/c but not in C3H/N mice. During WT-infection this switch was observed neither in Balb/c nor in C3H/N mice correlating with shorter survival times for these animals.

On the basis of these results, we propose that to survive an infection with African trypanosomes, mice require a type I cytokine environment during the early stage of infection, enabling them to control the first peak of parasitemia. Thereafter, a switch to a type II cytokine environment is required to enable progression of the disease into chronic phase.

MR1. Inmunología y daño tisular en la leishmaniosis tegumentaria: El papel de las células dendríticas.
TAPIA FJ, DÍAZ NL, PONCE LV, MONSALVE IB, FERMIN Z, CORADO J.

Laboratorio de Biología Molecular, Instituto de Biomedicina, Universidad Central de Venezuela, Caracas, Venezuela. ftapia@telcel.net.

Los primeros eventos de la defensa inmunológica ocurren en el sistema inmunitario periférico, constituido por tegumentos y órganos linfoides secundarios asociados. Las células epiteliales y las células dendríticas, protagonizan las fases de inmuno-estimulación y efectora de la respuesta inmunológica. En piel, el microambiente de defensa periférica, incluye células dendríticas, queratinocitos, linfocitos T cutáneo-específicos, endotelio vascular, ganglios linfáticos circunvecinos, citocinas, quimiocinas, y componentes de la matriz extracelular. Nuestro laboratorio ha demostrado que en la lesión de leishmaniosis cutánea difusa anérgica (LCD), los queratinocitos son incapaces de expresar señales accesorias (ICAM-1 y MHC-II), y presenta un número disminuido de células dendríticas epidérmicas. En leishmaniosis intermedia muco-cutánea o crónica (LCI), existe una expresión exacerbada de ICAM-1 y MHC-II y las células dendríticas están ausentes o disminuidas del epitelio lesionado. La epidermis en leishmaniosis cutánea localizada (LCL) manifiesta las señales accesorias adecuadas, expresión de ICAM-1 y MHC por los queratinocitos. La participación epidérmica, microambiente de citocinas (IFN- γ , IL-4 y TGF- β), neuropéptidos (CGRP y Sustancia P) y matriz extracelular condicionan el tipo de respuesta inmunitaria frente al parásito, siendo predominantemente Th1 en LCL, Th2 en LCD, y Th1/Th2 en LCI; todas asociadas con daño tisular. Además, estudios en modelos murinos de leishmaniosis, nos han permitido regular (por vía de transferencia adoptiva de células, cinta adhesiva, esteroides, éter monobenzil de hidroquinona, etc.) la densidad de células dendríticas durante la infección por *L.(L.) mexicana* y demostrar la capacidad de estas células en direccionar la respuesta inmunitaria participando en el control de la enfermedad. Financiado por la UNDP/World Bank/WHO Special Programme for research and training in tropical Disease, CONICIT S1-98000041, CDCH-UCV y Proyecto INCO-ERBICI8CT970213 de la Comunidad Europea.

MR1. Modelo de inmunización con *Trypanosoma rangeli* en la Enfermedad de Chagas experimental: Modificación del curso de la infección y del perfil de mediadores. BASSO B.

Fac. Ciencias Médicas, U.N.Córdoba y Servicio Nacional Chagas.

El *T. cruzi* presenta un ciclo biológico intra y extracelular, lo cual es un desafío para el sistema inmune, requiriendo para la resolución de la infección de una potente respuesta celular y humoral. Como ocurre en la mayoría de las enfermedades parasitarias, todavía no existen vacunas que puedan prevenir las infecciones por *T. cruzi*, por lo cual continúan las investigaciones sobre el desarrollo de vacunas preventivas o terapéuticas, que al menos minimicen los efectos adversos de la infección. En nuestro Laboratorio se ha desarrollado un modelo experimental de vacunación en ratones Balb/c empleando epimastigotes de *T. rangeli*, fijados con glutaraldehído, que modula la respuesta inmune frente al desafío con formas virulentas de *T. cruzi*. Esta inmunización induce una fuerte respuesta celular y humoral (IgG1 e IgG2a), que se traduce en bajas parasitemias, mayor sobrevivencia y ausencia de lesiones histológicas en el período crónico. Como en todo proceso infeccioso, la detección de citoquinas (CK) y sus receptores solubles en plasma, ayuda a definir el fenotipo celular principalmente involucrado en la respuesta inmune, lo que determina en gran medida la evolución de la infección. A los fines de conocer el perfil de CK y receptores solubles en nuestro modelo experimental, se estudiaron los niveles de algunas de ellas durante el período agudo de la infección. Los resultados obtenidos revelaron que los ratones inmunizados con *T. rangeli* e infectados con *T. cruzi* produjeron, con respecto a los sólo infectados, elevados niveles de IL12, potente estimulador de la respuesta inmune mediada por células y significativa disminución de las citoquinas proinflamatorias IL6 y TNF α . Por otra parte con respecto a esta última CK, los animales inmunizados revelaron aumento de las relaciones molares de los receptores solubles sTNF α R55/TNF y sTNF α R75/TNF, neutralizando la acción perjudicial del TNF α a nivel sistémico, responsable del shock séptico. Asimismo se observó producción elevada de IFN γ (citoquina con actividad protectora) tanto en los infectados como en los inmunizados e infectados. Sin embargo, IL10 sólo estuvo aumentada en los animales infectados, lo cual inhibiría la actividad biológica de IFN γ . No fue posible detectar a nivel plasmático IL2 e IL4, que deberán ser estudiadas in situ en futuras investigaciones, a los fines de poder evaluar las progenies TH1 y TH2 en este modelo. En este sentido, no debería esperarse una asociación unívoca entre resistencia y CK tipo TH1, sino una participación de ambas progenies, a la luz de los datos hallados. En conclusión, los resultados obtenidos en estos estudios indican que en nuestro modelo experimental, en los animales vacunados se favorecen los mecanismos de la inmunidad innata y adaptativa precoz, involucrados en la resolución de la infección en el período agudo, a través de la activación celular relacionada con la lisis parasitaria intracelular y de la presencia de anticuerpos tipo IgG1 e IgG2a. Asimismo, se ha observado la existencia de un adecuado equilibrio de CK y sus receptores solubles a nivel sistémico, que inducen un estado favorable para el huésped, permitiendo la resolución de la infección aguda y, posiblemente, minimizando respuestas adversas en el período crónico de la enfermedad.

MR1. Proliferación y activación celular en la infección experimental con *Trypanosoma cruzi*. CARDONI RL, ANTUNEZ MI.

Instituto Nacional de Parasitología "Dr M Fatała Chabén", ANLIS, Buenos Aires. Argentina. rlcardon@yahoo.com

En la fase aguda de la infección, la inducción de la respuesta Th1, y de la producción de IFN- γ a ella asociada, es uno de los elementos clave para la destrucción intracelular de los parásitos. Sin embargo, la mera presencia de IFN- γ no asegura la resistencia del huésped. Para ello es de gran importancia la cinética de su liberación. Evaluamos algunos elementos de la respuesta Th1 que podrían afectar los niveles de esta citoquina y, por ende, la resistencia del huésped. Medimos la activación de células T y NK, potenciales productoras de IFN- γ , así como las citoquinas que podrían sustentarla, en las células del bazo de ratones BALB/c y C3H infectados con *T. cruzi*, cepa Tulahuén.

Cercano al pico de parasitemia, en la 3ª semana pi (post-infección), los ratones de ambas cepas mostraron un notable incremento de la celularidad y de los blastos, indicando activación celular. A consecuencia de este cambio incrementó el número de células que expresaron TCR $\alpha\beta$ y CD4, marcadores de linfocitos T, a pesar de que sus porcentajes fueron similares o menores a los normales. El mismo efecto se observó en la fracción de blastos, aunque en los ratones C3H incrementó además el porcentaje de blastos T.

En la 3ª semana pi también incrementó el número total de células que expresaron el marcador DX5, de células NK, en ambas cepas de ratones. Sin embargo, los blastos NK incrementaron más tempranamente, a los 2 días pi, y en ambas cepas se acompañó de la producción de IL-12 p70. Sin embargo, tanto la actividad NK como la liberación de IFN- γ sólo incrementó en los ratones C3H. La activación temprana de NK y de la producción de IFN- γ podría estar relacionada con la mayor resistencia a la infección de los ratones C3H, en comparación con los BALB/c, en los que este efecto se produce tardíamente. Además, durante las 3 primeras semanas pi, en los ratones C3H, pero no en los BALB/c, incrementó la producción de IL-18, citoquina que colabora con la IL-12 para la producción de IFN- γ en células T y NK.

	Número de blastos DX5+/bazo ($\times 10^6$)			
	No infectado	2 pi	18 pi	Crónicos
BALB/c (n=5)	0.6 \pm 0.2	3 \pm 1*	8 \pm 1*	2.4 \pm 0.4*
C3H (n=5)	0.6 \pm 0.2	4 \pm 1*	8 \pm 2*	0.6 \pm 0.1

* Las diferencias con el normal son estadísticamente significativas ($p < 0.05$, t)

En la 3ª semana de la infección encontramos que parte de la población TCR $\alpha\beta$ + y de la CD4+, expresaron el marcador NK, sugiriendo la expansión de una población NKT, con marcadores de células T y de NK.

En la etapa crónica de la infección, ambas cepas de ratones mostraron un incremento del número total de células del bazo, así como del número de células T, mientras que las NK sólo aumentaron en los BALB/c. Al analizar los blastos, sólo se encontró un incremento del número de células T y NK activadas en los ratones BALB/c, en los que se producen niveles elevados de IFN- γ .

Los resultados mostraron una activación diferencial de células NK muy temprana, seguida por la de células T, NK y

NKT, acompañando al pico de parasitemia, en ambas cepas de ratones. En la fase crónica incrementó el total de células T, pero sólo se observó la activación de células T y NK en los ratones BALB/c.

El incremento del número de células del bazo productoras de IFN- γ y su activación no parece ser suficiente para la liberación de esta citoquina. Para ello tendría un papel clave la presencia de moléculas activadoras y/o inhibitoras. En la fase aguda, la resistencia a la infección estuvo relacionada con la producción simultánea de IL-18 y de IL-12p70 biológicamente activa en los primeros días de la infección. Así, en este sistema, la inducción de IL-18 parece ser el elemento clave para la efectividad de la respuesta Th1.

Financiado por FONCYT (BID 802/OC-AR N° 5-139-2330) y CONICET.

MR2: Bioquímica y Biología Molecular de protozoarios parásitos I

MR2. Formación de la pared del quiste en el protozoario intestinal *Giardia lamblia*. LUJÁN HD.

Cátedra de Química Biológica, Facultad de Ciencias Médicas. Universidad Nacional de Córdoba. Córdoba. Argentina. hlujan@biomed.uncor.edu

La particular capacidad que poseen los organismos parásitos para adaptarse a cambios del medio es una característica que ha atraído a investigadores científicos por décadas. La mayoría de los parásitos, ya sean unicelulares como los protozoos o multicelulares como los helmintos, ocupan diferentes nichos durante su travesía por vectores y huéspedes y han desarrollado efectivos mecanismos de adaptación que les permiten sobrevivir en ambientes hostiles. Con la intención de conocer más acerca de los procesos y mecanismos generales de adaptación y de diferenciación celular, nuestro equipo de trabajo se encuentra estudiando el proceso de diferenciación a quiste de *Giardia lamblia*. Este es un protozoo parásito que habita el intestino delgado de humanos y otros vertebrados y es causa común de enfermedad intestinal. Además de su importancia médica, *Giardia* es foco de notable interés en Biología puesto que es una de las células eucariotas más primitivas que se conocen. La forma vegetativa del parásito, el trofozoito, posee dos núcleos, pero carece de mitocondrias, peroxisomas y aparato de Golgi, organelas características de las células eucariotas. En el intestino algunos trofozoitos se diferencian a quistes, los que se liberan con las heces y transmiten la enfermedad. En los últimos años, mediante la utilización de métodos bioquímicos, inmunológicos y de biología molecular, hemos identificado el estímulo que inicia el enquistamiento de *Giardia* y caracterizado moléculas cuya expresión es inducida específicamente en este proceso (cyst wall protein 1 y 2, granule-specific protein, syntaxin, C4-protein, variant-specific surface protein 9B10, encystation-specific cysteine protease y dipeptidyl-proteinase) o son participantes fundamentales del mismo (BiP, PDI, fosfatasa ácida). Además, dilucidamos varios eventos moleculares comprometidos en la biogénesis del aparato de Golgi, los gránulos de secreción y el ensamblado y desensamblado de la pared quística extracelular. Los resultados obtenidos en el estudio de los mecanismos biológicos utilizados por *Giardia* durante su diferenciación permiten no sólo conocer nuevos blancos para la acción de agentes terapéuticos, la formulación de vacunas o el diseño de nuevas herramientas diagnósticas, sino que también proveen importante informa-

ción para comprender la evolución de procesos biológicos fundamentales de las células eucariotas.

MR2. Evolución de las Histonas en Protozoos Parásitos.

*TORO GC, *TRIANA O, *GALANTI N, **LUJAN H, ***MEDINA C.

*Programa de Biología Celular y Molecular, ICBM, Facultad de Medicina, U. de Chile. Santiago, Chile. **Departamento de Bioquímica - Biología, Escuela de Medicina, U. Nacional de Córdoba, Argentina. ***Facultad de Ciencias, U. de Chile.

Las histonas, proteínas involucradas en la organización y función de la cromatina en los eucariontes, se supone que son muy conservadas. Sin embargo, durante los últimos años, se ha encontrado que estas proteínas presentan un alto grado de divergencia en muchos de eucariontes primitivos. En Trypanosomatidos, se ha encontrado que las histonas H3 y H4, que son el centro de la organización nucleosomal, tienen más del 30% de divergencia con respecto a sus homólogas, mientras la histona H1 corresponde a solo uno de los tres dominios presentes en eucariontes superiores. Estos rasgos en Trypanosomatidos podrían explicar, en parte, la ausencia de condensación de la cromatina en cromosomas durante la división celular en estos parásitos.

La evolución de las histonas ha sido considerada como peculiar, con varias propuestas que son difíciles de reconciliar con los datos experimentales. En esta presentación, se propone que las histonas siguen una vía evolutiva semejante a otras proteínas. Considerando que los exones codifican para dominios estructurales y funcionales y que en el origen de los eucariontes, diversas proteínas fueron formadas por reordenamiento de exones, cabría esperar que estos dominios eventualmente fuesen encontrados en proteínas presentes en organismos que exhiben rasgos primitivos. Más aún, que estas unidades funcionaran independientemente.

Nuestros resultados en la estructura de los genes de histonas y sus proteínas en Trypanosomatidos, cumplen lo esperado. Sin embargo, *Giardia lamblia* que se supone más primitivo que Trypanosoma, presenta histonas con menores velocidades de sustitución que las de Trypanosoma, generando nuevas especulaciones en torno al genoma de los diferentes protozoos.

Financiado por SIDA-SAREC y D.I.D (Proyecto Enlace)

MR2. Glicosilfosfatidilinositoles en *Trypanosoma cruzi*. Primeras etapas de biosíntesis. LEDERKREMER RM.

CIHIDECAR. Depto. de Química Orgánica, Fac. de Cs. Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, Argentina. lederk@qo.fcen.uba.ar

Las glicoproteínas más importantes de *Trypanosoma cruzi* están ancladas a la membrana por glicosilfosfatidilinositol (GPI). Los GPI se encuentran en diferentes células eucariotas y todos presentan el "core": Etanolamina-PO₄-6Man(α1-2)Man(α1-6)Man(α1-4)GlcNH₂(α1-6)IPL.

El componente lipídico de los GPI de *T. cruzi* es frecuentemente una ceramida, como en la trans-sialidasa de formas trypomastigote¹, en la glicoproteína Ssp4 característica de las formas amastigote² y en las mucinas de formas metacíclicas³. Más aun, demostramos que la diferenciación extracelular de trypomastigotes a amastigotes es acompañada por un aumento del nivel de ceramida en el parásito². Es interesante, que no se encontró ceramida en las GPI de *Trypanosoma brucei* ni en las GPI de células de mamífero.

Las diferencias estructurales implican mecanismos biosintéticos y enzimas diferentes para la construcción de las anclas de *T. cruzi* y de mamíferos. El proceso de incorporación de ceramida en los GPIs de *T. cruzi* es, por lo tanto, un buen blanco para el diseño de agentes quimioterapéuticos.

La biosíntesis de GPI ha sido extensamente estudiada en *Trypanosoma brucei* utilizando un sistema de membranas libres de células⁴. Los GPI se sintetizan por la transferencia secuencial de monosacáridos a un PI unido a membrana. El primer paso de la biosíntesis consiste en la incorporación de N-acetilglucosamina. En *T. brucei* el PI aceptor para este primer paso tiene una composición diferente en ácidos grasos que el PI del GPI. Esto se explica por un proceso de remodelamiento lipídico⁵.

En *T. cruzi* es interesante estudiar si la inositol-fosfoceramida, componente abundante en las membranas de los tres estadios del parásito, es aceptor de GlcNH₂ a partir de UDP[³H]-GlcNAc o si la ceramida se incorpora en una etapa posterior por una reacción de remodelamiento del lípido.

Anclas GPI con ceramida se describieron en *S. cerevisiae*⁶. En este caso, un diacilglicerol se reemplaza por ceramida cuando el GPI está unido a la proteína.

En *Trypanosoma cruzi*, esto no sería un requisito pues se ha encontrado ceramida en glicoinositolfosfolípidos (GIPLs) abundantes como el LPPG que no está unido a proteína. Por incubación de membranas de *T. cruzi* con UDP[³H]-GlcNAc se determinó que la IPC endógena no es sustrato para el primer paso de síntesis del glicano. Se identificó el aceptor como PI con diacilglicerol (DAG) o alquilacilglicerol (AAG) y el producto como [³H]-GlcNAc-PI (DAG/AAG). La acción de una desacetilasa se evidenció por la formación de [³H]-GlcNH₂-PI (AAG). Se detectó también por primera vez un precursor fosfatado en la glucosamina. O sea, demostramos que en *T. cruzi* también hay un remodelamiento del lípido para llegar al GPI final libre o unido a proteína. Se continúan los estudios para definir la etapa de incorporación de la ceramida en los GPIs. Relacionado con estos trabajos, recientemente identificamos actividades enzimáticas de fosfolipasas A₁ y A₂, enzimas que liberan ácido graso de PI y GIPLs; una aciltransferasa responsable de la acilación de los monoacil o monoalquilglicerolípidos y dos actividades de fosfolipasa C, una que libera ceramida de IPC y otra alquilacilglicerol, alquilglicerol o diacilglicerol de los PI o de los GIPLs. Se detectó también una IPC-acido graso hidrolasa que libera ácido graso de IPC. Estas enzimas actuarían en las reacciones de remodelamiento que conducen a las anclas GPI en las glicoproteínas maduras de *T. cruzi*.

References

1. Agusti, R.; Couto, A.S.; Campetella, O.E.; Frasch, A.C.C. and Lederkremer, R.M. (1997) *Glycobiology*, 7, 731-735.
2. Bertello, L.E.; Andrews, N.W. and Lederkremer, R.M. (1996). *Mol. Biochem. Parasitol.*, 79, 143-151.
3. Acosta Serrano, A.; Schenkman, S.; Yoshida, N.; Mehlert, A.; Richardson, J. and Ferguson, M.A.J (1995) *J. Biol. Chem.*, 270, 27244-27253.
4. Masterson W.J.; Doering T.L.; Hart G.W. and Englund P.T. (1989) *Cell* 56, 793-800.
5. Englund, P.T. (1993) *Annu. Rev. Biochem.*, 62, 121-138.
6. Reggiori, F.; Canivenc-Gansel, E. and Conzelmann, A. (1997) *EMBO J.*, 16, 3506-3518.
7. Bertello, L.E.; Alves, M.J.M.; Colli, W. and Lederkremer, R.M. (2000) *Biochem. J.* 345, 77-84.

MR2. Variación del core proteico de mucinas de *Trypanosoma cruzi* según el hospedador. DI NOIA JM; SANCHEZ DO y FRASCH ACC

IIB-INTECH (UNIVERSIDAD NACIONAL DE GENERAL SAN MARTIN-CONICET) - San Martín - Pcia. de Buenos Aires - Argentina. jdinoia@iib.unsam.edu.ar

Al menos dos de los estadios de *Trypanosoma cruzi* (i.e. epimastigotes y tripomastigotes sanguíneos) poseen mucinas ancladas por glicosilfosfatidil inositol (GPI) a su membrana plasmática, formando una cubierta densa. Las mucinas son glicoproteínas altamente O-glicosiladas ricas en Thr y/o Ser. En *T. cruzi* están involucradas en la protección del parásito contra la vía alternativa del complemento y contra anticuerpos líticos en el humano, así como en el proceso de invasión de células. Estas funciones se relacionan con su capacidad de ser los principales aceptores de ácido siálico, que el parásito obtiene del medio utilizando una actividad trans-sialidasa. Hemos descrito dos familias multigénicas que codifican mucinas presentes en ambos estadios mencionados.

La primera familia, denominada TcMUC, consta de entre 500 y 700 genes por genoma haploide. Los productos deducidos poseen una estructura común, con un péptido señal en el amino terminal, seguido por un dominio central variable y un extremo carboxilo terminal conservado que incluye una señal para anclaje por GPI. El dominio central está compuesto por regiones únicas no repetitivas y diferentes entre los miembros, o por un número variable de repeticiones T8KP2 dispuestas en tandem. Mediante experimentos de transfección se demostró que este último grupo codifica mucinas y que las repeticiones están O-glicosiladas. El análisis de la expresión del ARNm y los estudios de serología de ratones infectados utilizando proteínas recombinantes para detectar anticuerpos específicos indicaron que estas mucinas están presentes en los estadios del parásito que habitan en el hospedador vertebrado. La pequeña secuencia (de 8 a 17 aminoácidos) entre el péptido señal y la región de las repeticiones codifica para el extremo amino terminal maduro y es hipervariable (HV), presentando 22 variantes sobre 32 clones analizados. Estas regiones HV, fueron reconocidas por anticuerpos de infecciones experimentales y naturales, sugiriendo que existen realmente en la molécula madura. En general se acepta que la presencia de un alto número de variantes en epitopes expuestos en la membrana de un patógeno es consecuencia de la presión de selección del sistema inmune. El reconocimiento de esta región por anticuerpos o linfocitos tendría entonces un efecto negativo sobre el parásito y por lo tanto la presencia de un alto número de variantes expuestas simultánea o alternadamente sería una estrategia de inmuno-evasión, retrasando o previniendo una respuesta de alta afinidad durante la infección temprana.

La segunda familia, denominada TcSMUG, es menos compleja que la recién descrita aunque ambas están relacionadas cuando se comparan las proteínas deducidas, que poseen también señales de importación al retículo endoplásmico y de anclaje por GPI. Está compuesta de entre 70 y 80 genes por genoma haploide, organizados en tandems y divididos en dos grupos denominados S y L que difieren en su región central, siendo los miembros de cada grupo homogéneos. Hay varias evidencias, incluyendo el patrón de expresión de ARNm, el tamaño de las proteínas deducidas y la comparación con secuencias de proteína obtenidas del N-terminal de mucinas purificadas, que indi-

can que el grupo S codifica para el core proteico de mucinas del estadio epimastigote. La ausencia de regiones variables en estos productos se correlaciona con su expresión en estadios presentes en el insecto, en el que no hay una respuesta inmune específica de alta afinidad.

Las dos familias descritas, TcMUC y TcSMUG, codifican para apomucinas expresadas en diferentes estadios del parásito, presentes en los hospedadores mamífero e insecto, respectivamente. Dadas las características diferentes de estos dos tipos de mucinas y sus core proteicos, parecen haber sido seleccionadas para enfrentar ambientes tan diferentes como el sistema digestivo del vector y el sistema inmune del mamífero. La expresión de ambas familias está regulada durante el ciclo de vida a nivel post-transcripcional y se ha identificado al menos un mecanismo, que involucra regiones ricas en AU presentes en las regiones 3' no codificantes de los transcritos de la familia TcSMUG, que causa desestabilización de los ARNm en forma estadio específica.

MR3: Ecología, fisiología y toxicología de los vectores de Chagas

MR3. Variables ambientales como indicadores de la distribución geográfica de Triatominae. GORLA D.

CRILAR. Argentina. dgorla@crilar.com.ar

La distribución geográfica de Triatominae está bien conocida sólo para las especies domésticas, el grupo con la importancia epidemiológica mayor, especialmente en países con sistemas de vigilancia epidemiológica bien establecidos. La mayoría de las especies peridomésticas y las silvestres están pobremente conocidas, tanto en términos de su biología como de su distribución geográfica.

Luego de la progresiva eliminación de las especies primarias a partir de las iniciativas de control en América Central y del Sur, comenzaron a incrementarse los reportes de otras especies que se establecen en el ambiente domiciliario. En muchos casos, las nuevas infestaciones involucran especies pobremente conocidas y previamente consideradas como exclusivamente silvestres. Cambios en el uso de la tierra están frecuentemente asociados con un proceso creciente de domesticación de Triatominae silvestres, con el consecuente incremento del riesgo de transmisión chagásica a humanos.

En este trabajo se estudió la distribución geográfica de especies de Triatominae usando información sobre variables ambientales (estado de la vegetación, precipitaciones, altura del terreno, etc.). Entre las especies consideradas se encuentran *Triatoma infestans* (representando un extremo de adaptación al ambiente domiciliario en los países del cono sur sudamericano), *T. brasiliensis* (habitante de ambientes peridomiciliarios, con elevado potencial para invadir ambientes domésticos en el nordeste de Brasil) y *Rhodnius pallescens* (peridoméstico y silvestre en Colombia).

La hipótesis de trabajo establece que un conjunto de variables ambientales puede ser usado como indicadores de la distribución geográfica de Triatominae. El estudio usó una serie temporal de imágenes semanales del índice normalizado de vegetación (NDVI) producido por satélites meteorológicos de la serie NOAA, precipitación mensual y altura del terreno de América del Sur y Central. Un análisis de componentes principales mostró que los 3 primeros componentes calculados a partir de la serie semanal de imágenes del NDVI

y mensual de lluvias contienen más del 95% de la variación espacial y temporal de la vegetación y de la precipitación. Datos colectados en terreno sobre presencia de cada especie en localidades referenciadas geográficamente fueron usados para extraer las características estadísticas de las localidades sobre el espacio multidimensional definido por la altura del terreno y la variación espacial y temporal de la vegetación y lluvia. Usando luego álgebra de imágenes a través de algoritmos de clasificación supervisada se identificaron todas las áreas con características espaciales y temporales similares a aquellas donde fueron hallados los especímenes en campo. Las áreas resultantes representan la distribución geográfica potencial de las especies estudiadas. Las distribuciones resultantes coinciden estrechamente con las distribuciones de las especies mejor conocidas (*T. infestans* y *T. brasiliensis*) y/o identifican áreas con la más alta probabilidad de hallazgos para la especie menos conocida (*R. pallens*).

El enfoque de trabajo permite formular hipótesis que pueden validarse con datos independientes de terreno, en tanto que los resultados obtenidos sugieren que la identificación del "espacio" ecológico multivariado, definido por conjuntos de variables físicas ambientales puede utilizarse para realizar predicciones sobre riesgo de transmisión vectorial, tanto para áreas con poco conocimiento de terreno de los vectores como para la identificación de áreas con más alto potencial de reinfestación de aquellos casos donde las especies de vectores están mejor conocidas.

MR3. Feromonas sexuales y de agregación en *Triatoma infestans*. FONTAN A.

Centro de Investigaciones de Plagas e Insecticidas (CIPEIN-CITEFA/CONICET).

El control del *Triatoma infestans*, chinche hematófaga principal vector de la Enfermedad de Chagas en Argentina, se llevó a cabo en las últimas décadas utilizando insecticidas piretroides. La efectividad de estas campañas de control generó un nuevo escenario de distribución geográfica y densidades poblacionales de Triatominos que favorece la aplicación de otras estrategias de control. En este contexto es posible implementar con éxito metodologías de menor impacto ambiental utilizando semioquímicos mediadores de algunas pautas de comportamiento aplicados a trampas u otros dispositivos. En tal sentido el estudio de la ecología química de estos insectos es sumamente relevante. Desde hace varias décadas es conocida la existencia en *T. infestans* de feromonas atrayentes de machos emitidas durante la cópula, así como de compuestos agregantes presentes en las heces. Sin embargo, hasta hace algunos años sólo era conocida la naturaleza química de compuestos emitidos en condiciones de alarma tales como ácidos de cadena cortas, fundamentalmente isobutírico. En heces fue identificado el amoníaco así como metil y dimetilquinazolina y o-aminoacetofenona. Sin embargo, la aparición de nuevas metodologías analíticas de mayor sensibilidad permitió un nuevo análisis de las emisiones de estos insectos e instauró un nuevo interés en el tema.

En nuestro laboratorio se analizaron las emisiones de parejas de *T. infestans* en cópula. Para tal fin los compuestos volátiles fueron colectados en porapak-Q a partir de aire (100ml/min) filtrado por carbón activado pasando a través de un recipiente Pirex conteniendo 7 machos y 7 hembras. Los compuestos fueron desorbidos con diclorometano y analizados por CG Capilar y CG-EM luego de haber sido confirmada su capacidad atrayente. Estos estudios demos-

traron la presencia de una mezcla compleja de compuestos identificados como 2 y 3 metil-butan-1-ol en una relación 2:1, ácidos de cadena corta (etanoico a nonanoico), ácidos de cadena larga (decanoico a (Z)-9-octadecenoico), aldehídos alifáticos y otros compuestos como benzaldehído y propano,1,1-tiobis. Los estudios de EAG realizados con series homólogas de aldehídos alifáticos sobre hembras y machos mostraron un incremento en la intensidad de la respuesta, a una dosis dada, en función del aumento en la longitud de la cadena hasta el nonanal, disminuyendo para longitudes mayores. La capacidad atrayente de los principales compuestos identificados formulados en polietilenglicol 400 se evaluó sobre hembras y machos en una arena circular de 20 cm de diámetro utilizando un sistema de video. No se obtuvieron respuestas a mezclas de (S,R)2 y 3 metil-butan-1-ol. Se testearon aldehídos lineales de entre 7 y 10 C y se obtuvieron respuestas sobre hembras para hexanal y heptanal, mientras que el nonanal resultó efectivo sobre machos. El benzaldehído resultó también activo sobre hembras. Se analizaron los blends de compuestos activos resultando la mezcla de hexanal:benzaldehído activa en forma aditiva respecto de cada uno de los compuestos. Se evaluó también la efectividad como atrayente de compuestos capaces de liberar amoníaco. Se analizaron diferentes sales higroscópicas como cloruro, acetato y carbonato de amonio. Sólo el cloruro de amonio resultó ser efectivo, observándose una gran dependencia de la tasa de liberación de amoníaco en la actividad de estas sales. Otros compuestos nitrogenados presumiblemente presentes en heces como la metil amina resultó ser activa cuando se la evaluó sobre ninfas. Por otra parte mezclas 1:1 de metil:dimetil quinazolinas atrayeron hembras y ninfas V. Distintas formulaciones de varios de estos compuestos se incorporaron a trampas y se encuentran en evaluación en la actualidad en gallineros experimentales como un paso previo a su evaluación a campo. El objetivo final de este trabajo es la obtención de una trampa biocida cebada con feromonas aplicable en estrategias de monitoreo y control de Triatominos vectores de la Enfermedad de Chagas.

MR3. Actualización de la biología de triatominos. CANALE DM.

Servicio Nacional de Chagas. Córdoba.
soniablanc@arnet.com.ar

Un importante aspecto para planificar la lucha contra los vectores de la enfermedad de Chagas es el conocimiento de los hábitats donde las diferentes especies triatomínicas pueden encontrarse, lo que permite precisar los límites de las acciones de control. Otro aspecto que debe ser incorporado es el conocimiento de las zonas ecológicas donde prevalecen las especies, lo que permite diferenciar las zonas que, por sus características climáticas o biogeográficas, merecen una atención prioritaria. En la actualidad se considera que son 17 las especies de triatominos existentes en la Argentina. Estas especies difieren en importancia epidemiológica según su hábitat y densidad poblacional. La mayoría de ellas son silvestres y/o peridomiciliarias, siendo excepcionalmente atraídas por la luz, llegando ejemplares adultos a las viviendas pero sin colonizar en ellas, por lo que carecen de importancia en el ámbito de la Salud Pública. Otras, como *T. guasayana*, *T. sórdida* y *T. eratyrisiformis*, si bien son especies silvestres y peridomiciliarias, en algunos casos colonizan la vivienda humana. *T. infestans* es el único triatomino domiciliado, su hábitat se restringe a ecotopos creados por el hombre, sien-

do excepcional en ambientes silvestres. Entre 1992 y 1997 se realizó un estudio en viviendas rurales de la Pcia. de Santiago del Estero, cuyo objetivo fue identificar el origen y estudiar la dinámica de la reinfestación domiciliar por *T. infestans* ocurrida después de un rociado con Deltametrina. El índice de infestación pre-tratamiento fue del 93% (81% en domicilio y 47% en peridomicilio). Las primeras colonizaciones peridomiciliarias fueron detectadas al año post-intervención y la primera recolonización domiciliar ocurrió 18 meses después en una comunidad y 3 años después en la otra. Durante 30 meses de seguimiento la proporción de viviendas en cuyos domicilios o peridomicilios se capturaron *T. infestans* se mantuvo casi constante, osciló entre el 3% y el 9%; el número de peridomicilios infestados fue el doble que el de domicilios y la cantidad de ejemplares capturados fue seis veces mayor en peridomicilios. El peridomicilio constituyó el lugar de origen de la reinfestación domiciliar a partir de focos residuales o preexistentes. La presencia de gallinas empollando en el domicilio estuvo asociada significativamente con la abundancia de *T. infestans* y marginalmente con la infestación (con gallinas: infest.90%, abundancia 18, sin gallinas: infest.74%, abundancia 4). A lo largo de este proceso de reinfestación otros triatomos silvestres y peridomiciliarios, tales como *T. guasayana* y *T. garciabesi* se encontraron en forma abundante y persistente en las áreas peridomiciliarias, pero sin colonizar las viviendas. *T. garciabesi* superó a *T. guasayana* en el número de ecotopos infestados, de colonias y de individuos colectados, sin embargo no se produjeron invasiones domiciliarias de ejemplares adultos, como ocurrió frecuentemente con *T. guasayana*. El impacto de las acciones de control sobre la prevalencia de *T. cruzi* en *T. infestans* fue muy importante, después del control químico disminuyó del 49% al 4,6% en domicilios y del 6% al 1,8% en peridomicilios. El índice de infección por *T. cruzi* en el período 1993-1997 fue de 2,4% en la unidad domiciliar para *T. infestans*, 0,7% para *T. guasayana* y 0,2% para *T. garciabesi*. Los ejemplares infectados de las otras dos especies correspondían al peridomicilio. Este estudio demostraría que en la actualidad y en la zona estudiada, estas especies peridomiciliarias no tienen importancia en el ámbito de la salud pública, si bien *T. guasayana*, al haberse hallado infectada por *T. cruzi* y debido a su frecuente invasión de la vivienda, con ataques a humanos y a perros, se comportaría como vector secundario en las áreas domésticas y peridomésticas durante el período de vigilancia. En ranchos experimentales construidos con una disponibilidad de refugios máxima intermedia y mínima, colonizados con *T. infestans* y con un seguimiento de dos años, se encontró que la abundancia del insecto y la fecundidad mediana fueron superiores en los ranchos con máxima disponibilidad de refugios, evidencias que apoyan la hipótesis que el espacio físico limitaría el crecimiento poblacional de esta especie. Después de tres a cinco años de realizar actividades de vigilancia y retratamiento de las viviendas reinfestadas, *T. infestans* no pudo eliminarse. Estos y otros estudios ponen de relieve las dificultades que surgen al tratar de eliminar esta especie de comunidades rurales. El control vectorial no se logra únicamente con la aplicación de insecticidas, se debe tender a un control integrado, donde la educación es sumamente importante para lograr un cambio en las prácticas culturales. Medidas de manejo ambiental basadas en la reducción de refugios y animales domésticos en las viviendas rurales, permitirá mejorar el control de los triatomos y, por ende, la transmisión vectorial de la enfermedad de Chagas.

MR3. Efectos letales y subletales de insecticidas piretroides en vinchucas. ALZOGARAY RA.

Centro de Investigaciones de Plagas e Insecticidas (CIPEIN-CITEFA/CONICET) y Universidad Nacional de General San Martín (UNSAM).

La chinche hematófaga *Triatoma infestans* (Klug), comúnmente conocida como vinchuca, es el principal vector de la Enfermedad de Chagas en Argentina y la forma más efectiva de controlarla es la aplicación de insecticidas en los domicilios. En las últimas dos décadas, los insecticidas piretroides se han convertido en la principal herramienta química para el control de los vectores de Chagas en Argentina y otros países de América Central y del Sur. En la presente exposición, se presentarán los experimentos realizados en el CIPEIN con el objetivo de caracterizar la toxicología de los piretroides en vinchuca, con particular atención en aquellos que se usan habitualmente en las campañas de control de vectores. Los resultados se reseñan a continuación.

(1) En general, la toxicidad de los piretroides, estimada mediante valores de Concentración Efectiva 50% (CE50), fue mayor a 16 que a 28°C, pero se observaron excepciones que dependieron del insecticida y del estadio ninfal; (2) la velocidad de aparición de los síntomas de intoxicación, estimada mediante valores de Tiempo Efectivo 50% (TE50), aumentó al disminuir la temperatura, pero la variación no fue tan drástica como la observada para los valores de CE50; (3) insectos mantenidos a 16°C, que presentaban severos síntomas de intoxicación, se recuperaron por completo unos pocos minutos después de ser transferidos a 28°C; inversamente, insectos asintomáticos mantenidos a 28°C, presentaron rápidamente los síntomas al ser transferidos a 16°C; (4) los insectos tratados con piretroides mostraron una alta tasa de recuperación (desaparición de los síntomas en función del tiempo transcurrido desde la aplicación), pero no se observó recuperación cuando se aplicó simultáneamente butóxido de piperonilo (esta sustancia es un sinergista que inhibe la actividad de las oxidasas microsomaes de función mixta, enzimas involucradas en el metabolismo de los piretroides). La permetrina, una mezcla de moléculas llamadas *cis*-permetrina y *trans*-permetrina, es un piretroide que no ha sido adoptado para controlar los vectores de Chagas, principalmente porque presenta una relación costo-beneficio desfavorable. En la vinchuca, (5) la *trans*-permetrina presentó una baja actividad insecticida e interfirió con la acción de la *cis*-permetrina (efecto antagonístico); (6) aplicada individualmente, la *cis*-permetrina fue tan tóxica como la deltametrina, que es uno de los piretroides con mayor actividad insecticida en vinchuca. Mediante el uso de un analizador de imágenes, fue posible diferenciar efectos sobre la actividad locomotora de los insectos y repelencia. (7) Todos los piretroides estudiados produjeron un importante aumento de la actividad locomotora (hiperactividad), y los cianopiretroides fueron los más efectivos en hacerlo que los no ciano; (8) no se observó repelencia producida por concentraciones de hasta 25 veces la recomendada para aplicación en campo de deltametrina.

La influencia de la temperatura sobre la toxicidad de los piretroides, los efectos de estas sustancias sobre el comportamiento de los insectos y la capacidad de recuperación de las vinchucas son factores que afectan los resultados de las estrategias de control y entonces deberían ser tenidos en cuenta al planificarlas. El estudio de efectos subletales de los piretroides, por ejemplo hiperactividad y

repelencia, puede contribuir a comprender mejor fenómenos como la reinfestación domiciliar y la distribución espacial de los insectos expuestos a insecticidas. Si se considera que muchos piretroides son mezclas de moléculas que individualmente presentan diferentes propiedades toxicológicas, la identificación de aquellas con mayor actividad insecticida es un camino que vale la pena explorar para evitar el uso de sustancias poco efectivas y para disminuir la cantidad de tóxicos aplicados. La purificación o la síntesis selectiva de las moléculas más activas puede ser un punto de partida relativamente poco costoso para la preparación de nuevos formulados y representa una valiosa alternativa para los países en vías de desarrollo.

MR4: Diagnóstico y control de las infecciones bacterianas

MR4. Listeriosis. LEARDINI NA.

Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas, ANLIS "Dr. Carlos G. Malbrán" Buenos Aires, Argentina. nleardini@anlis.gov.ar.

Es una enfermedad común al hombre y a animales, de allí que en cierto momento se la consideró una antropozoonosis. Tanto en uno como en otro caso se presenta bajo forma neurológica, séptica o genital, esta última como aborto o parto prematuro.

Listeria monocytogenes es la principal especie infectante, encontrándose como colonizante en tracto intestinal humano y animal.

Se caracteriza por su amplia distribución ambiental y es frecuente hallarlo como contaminante en alimentos, a partir de los cuales infecta al hombre. Por ello actualmente es considerada una enfermedad de origen alimentario (ETA).

Se han realizado investigaciones sobre la evolución de los aislamientos en la República Argentina, encontrándose un incremento significativo comparando décadas diferentes.

Desde 1990 nuestro Servicio participa en un programa internacional de vigilancia activa de listeriosis dependiente de OMS, mediante el intercambio de información y metodologías estandarizadas.

Las cepas sospechosas aisladas en el país, son derivadas desde distintos laboratorios regionales, para identificación, serotipificación y subtipificación.

El diagnóstico de especie se basa en un número seleccionado de marcadores bioquímicos acompañados siempre por los caracteres fisiológicos de movilidad, hemólisis y la prueba de CAMP diferencial frente a *Staphylococcus aureus* y *Rhodococcus equi*.

El esquema de serotipificación seguido es el de Seeliger y Höne (1979).

Los informes sobre *Listeria monocytogenes* han sufrido un crecimiento significativo en la década del 90, continuando los valores en aumento.

Durante la segunda parte de este período, se ha notado también una aparición inusual de casos esporádicos en niños, con edades que oscilan entre 1 y 14 años. Solamente en la mitad de los casos se tuvo información sobre condiciones de base predisponentes.

También resulta llamativo en los últimos tiempos el número elevado de aislamientos a partir de alimentos precocidos de origen cárnico, desviándose además el predominio de *L. monocytogenes* serotipo 4 hacia el serotipo 1.

Dado que la tendencia general hacia el aumento continúa, se ha propuesto en los foros correspondientes que

Listeriosis sea considerada enfermedad de notificación obligatoria, para establecer una correcta vigilancia epidemiológica incluyendo el nivel molecular, para detectar posibles brotes de origen alimentario o nosocomial. Es imperativo que los casos clínicos sospechosos sean notificados rápidamente de modo que se inicie la investigación del origen. Es importante advertir sobre los grupos poblacionales susceptibles, especialmente embarazadas, recién nacidos, gerontes e inmunocomprometidos. Los adultos sanos y los niños sólo se infectan con *Listeria* en forma ocasional, pero raramente enferman gravemente.

Finalmente, si bien los aumentos mencionados pueden deberse a un mayor interés despertado por la patología listérica, y el consecuente mejoramiento de los métodos diagnósticos, su magnitud indicaría un incremento de casos, ya sea debido al cambio de los hábitos alimentarios o a la modificación de los sistemas de almacenamiento, con la ampliación de las cadenas de frío en la comercialización de los productos alimenticios.

MR4. Diagnóstico y control de brucelosis humana. LUCERO NE.

ANLIS "Dr.C.G.Malbrán", Avda. Velez Sarsfield 563, Buenos Aires, Argentina.nidia@elsitio.net.

La brucelosis es una de las zoonosis de mayor distribución en el mundo e incluida por la Oficina Internacional de Epizootias dentro de las enfermedades transmisibles de la Lista B. Su reciente reemergencia en el área del Mediterráneo indica la dificultad en erradicar la infección. La enfermedad en el hombre está directamente relacionada con la prevalencia en los animales y en América Latina los países donde se registran mayor número de casos son Argentina, México y Perú, en los cuales la notificación es obligatoria. Si bien en estos países la verdadera incidencia no se conoce, *B. melitensis* es el agente causal de la mayoría de los casos, seguida por *B. suis* que persiste en los animales domésticos. Los casos se definen en base al examen clínico, la información epidemiológica y los estudios de laboratorio. Se clasifican como sospechoso cuando los dos primeros son compatibles con la enfermedad, probable cuando además una prueba tamiz resulta positiva y confirmado cuando también son positivos los estudios de laboratorio. Puede cursar de manera asintomática, presentar signos y síntomas inespecíficos o complicaciones osteoarticulares, gastrointestinales, hepatobiliares, neurológicas, cardiovasculares, genitourinarias o pulmonares. El grupo de riesgo esta constituido por trabajadores rurales, de frigoríficos, mataderos, curtiembres, laboratoristas y población que consume derivados lácteos sin control sanitario. En el laboratorio el diagnóstico bacteriológico es de certeza y permite tomar medidas para limitar los alcances de la infección. En la actualidad el desarrollo de métodos automatizados, al facilitar los aislamientos a partir de hemocultivos, ha puesto en evidencia que se trata de una enfermedad subdiagnosticada ya que se aísla *Brucella* en pacientes donde no se sospechaba la enfermedad. En laboratorios hospitalarios que utilizan los sistemas rápidos de identificación se puede confundir el género *Brucella* con *Moraxella phenylpyruvica*. El estudio de la respuesta inmune prueba indirectamente el contacto con el germen, es útil para el seguimiento del paciente y para evaluar el éxito del tratamiento. Se utilizan pruebas serológicas clásicas como las de aglutinación y fijación de complemento (CF) o modernas técnicas inmunoenzimáticas. La prueba tamiz mas difundida es la de Huddleson, actualmente en desuso. Ha sido reemplazada por

técnicas que emplean antígenos tamponados como Rosa de Bengala o Buffered Plate Antigen (BPA), los cuales reducen las aglutinaciones inespecíficas, esta última es la recomendada por ser ligeramente más sensible. Entre las nuevas pruebas la ELISA de competición (CELISA) utiliza un anticuerpo monoclonal específico para un epítipo de la cadena O del S-LPS de *Brucella*, que compite con el suero problema por el antígeno. Es económica, sensible, específica, no da reacción cruzada con otros gérmenes Gram negativos y puede ser estandarizada a nivel nacional e internacional. Es de destacar la necesidad de la validación de las pruebas empleadas en el diagnóstico, el control de calidad de los reactivos y la estandarización de las técnicas para asegurar la uniformidad de los resultados. El diagnóstico confiable y el tratamiento eficaz contribuye a la recuperación de los enfermos, a la vez que la notificación de los casos permiten el conocimiento de la epidemiología de la infección y por ende la evaluación de los planes de control en los animales. Con el fin de estandarizar y asistir en el diagnóstico en 1994 se creó la Red Nacional de Brucelosis que hoy integran 8 provincias, en su mayoría del NO Argentino, las que a su vez se organizan en redes locales. La coordinación de la Red la realiza el laboratorio de brucelosis de la ANLIS el cual capacita en técnicas de diagnóstico, asesora en la interpretación de los resultados, distribuye reactivos de referencia, efectúa el control de calidad del diagnóstico mediante el envío de sueros liofilizados con título conocido y colabora en programas educativos tendientes al control de la enfermedad. También se incentiva el desarrollo del diagnóstico bacteriológico, distribuyendo medios de cultivo y prestando el servicio de aislamiento y tipificación de cepas de *Brucella*.

MR4. Síndrome Urémico Hemolítico. RIVAS M.

Servicio Fisiopatogenia, Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas – ANLIS “Dr. Carlos G. Malbrán” Buenos Aires, Argentina. mrvivas@anlis.gov.ar.

El Síndrome Urémico Hemolítico (SUH) es una entidad clínica y anatomopatológica caracterizada por insuficiencia renal aguda, trombocitopenia y anemia hemolítica microangiopática. En Argentina, es la primera causa de insuficiencia renal aguda en la infancia y la segunda de insuficiencia renal crónica, siendo además responsable del 30% de los trasplantes renales en niños y adolescentes. Se producen alrededor de 300 casos nuevos por año, pero con un importante subregistro. En 1999, el Ministerio de Salud ha establecido que el SUH es una enfermedad de notificación obligatoria (Resolución N° 346/00). El año pasado, la tasa de incidencia estimada fue de 9,2 casos por cada 100.000 niños menores de 5 años, registrándose más de 7.000 casos desde 1965 hasta el presente. Estos valores son los más elevados del mundo. Los niños afectados son menores de 5 años, fundamentalmente entre 6 y 36 meses, de ambos sexos, eutróficos, de buenas condiciones higiénico-sanitarias. En la mayoría de estos niños la diarrea que caracteriza al período prodromático es el primer episodio de sus vidas. La enfermedad está distribuida en todo el país, pero la frecuencia es mayor en las provincias del centro y sur durante los meses cálidos, aunque se registran casos durante todo el año. Durante la década del 50 y principios de la del 60 la letalidad era mayor al 30%. El diagnóstico precoz de la enfermedad y la instauración temprana de la diálisis en aquellos casos con oliguria severa o anuria, ha disminuido la letalidad, siendo en la actualidad del orden del 2-3%. Superada la fase aguda, un 30% de los pacientes

quedan con microhematuria o proteinuria persistente, y un porcentaje de ellos evoluciona, al cabo de años o décadas, hacia una enfermedad renal terminal y requerirán diálisis crónica o trasplante renal. El SUH post-entérico, forma endémica en nuestro país, está asociado a la infección por *Escherichia coli* productor de toxina Shiga (STEC). En Argentina, aproximadamente el 60% de los pacientes con SUH presentan evidencias de infección por STEC. Los factores de virulencia de las cepas STEC son: a) las toxinas Shiga (Stx1, Stx2 y variantes de Stx2); b) la intimina, proteína codificada por el gen *eae*, responsable de la unión a su receptor (Tir) localizado en el enterocito y de la desorganización de las microvellosidades (lesión AE). Ambos genes (*eae* y *tir*) están localizados en la región LEE del cromosoma bacteriano; c) una novel hemolisina, enterohemolisina (E-Hly), codificada por un plásmido de 60Mda. Stx2 tiene una actividad citotóxica 100 veces superior a Stx1. La mayoría de las cepas STEC aisladas en Argentina portan los genes *eae/stx2 + stx2vh-a/E-hly*, lo cual podría explicar el número elevado de pacientes que evolucionan a SUH.

El Servicio Fisiopatogenia es el Laboratorio Nacional de Referencia (LNR) para SUH e infecciones por STEC. Utiliza tres criterios diagnósticos: 1) aislamiento y tipificación de STEC, 2) detección de toxina Shiga libre en materia fecal, 3) detección de anticuerpos neutralizantes anti-toxina Shiga. Realiza además, la caracterización fenotípica de aislamientos de distintos orígenes (alimentos, animales), estableciendo la relación clonal mediante técnicas de subtipificación (electroforesis de campos pulsados y fagotipificación). A partir del año 1999, se han iniciado actividades para establecer un sistema de vigilancia del SUH y las infecciones por STEC en hospitales centinela de los países del Cono Sur (Argentina, Bolivia, Brasil, Chile, Paraguay y Uruguay). Estas actividades están auspiciadas por la Oficina Sanitaria Panamericana y el Centers for Diseases Control and Prevention (CDC) de los EE.UU, en el marco de la Vigilancia de las Enfermedades Infecciosas Emergentes. Se ha realizado, en junio de este año, una Reunión Plenaria con la participación de epidemiólogos, nefrólogos y laboratoristas de los países de la región, para establecer un sistema de vigilancia único y un Taller de Capacitación en técnicas diagnósticas para establecer la infección por STEC. La implementación de la vigilancia del SUH y de las infecciones por STEC permitirá: obtener resultados de alta calidad, proveer una base de datos estable para realizar la comparación a través del tiempo y facilitar la implementación de las estrategias de prevención y control y priorización de futuras investigaciones, tal como lo enfatiza la Organización Mundial de la Salud.

MR5: Bioquímica y biología molecular de protozoarios parásitos II

MR5. In search of novel targets for the development of specific trypanocidal agents. KALISZ HM.

G.B.F. Braunschweig, Germany. kalisz@gbf.de.

The incidence of infectious diseases caused by parasitic protozoa has increased steadily in recent years, partly due to the increase in the numbers of drug resistant strains and partly due to the inefficacy of currently available antiprotozoan agents. There is therefore a need for the development of alternative, more specific chemotherapeutic agents, for example by exploiting the differences in the

metabolic pathways of the parasites and their mammalian hosts.

Two potential targets for chemotherapeutic drug design are the trypanothione peroxidase system and the aromatic amino acid metabolism of the parasites. The trypanosomatid peroxidase system is critical for hydroperoxide detoxification and hence survival of the parasites under aerobic conditions. It comprises the peculiar redox metabolite trypanothione, a bisglutathionyl derivative of glutathione, trypanothione reductase, and the two recently discovered thiol-disulphide oxidoreductases; tryparedoxin and tryparedoxin peroxidase. Tryparedoxin peroxidase is a member of the peroxiredoxin family and is homologous to thioredoxin peroxidases, whereas tryparedoxin is related to the thioredoxins. Aromatic amino acid metabolism, on the other hand, is postulated to be involved in cytosolic NADH oxidation and methionine recycling. It thus differs from the analogous mammalian metabolism which involves oxidation of most amino acids in the Krebs cycle and the conversion of the released amino groups to urea. Furthermore, the enzyme involved in trypanosomal amino acid metabolism, tyrosine aminotransferase, differs from mammalian tyrosine aminotransferases in its preference for pyruvate and α -ketomethylbutyrate over α -ketoglutarate and in its broader substrate specificity. All three enzymes, tryparedoxin, tryparedoxin peroxidase and tyrosine aminotransferase, are presumed to be essential for the parasite and sufficiently distinct from the analogous host enzymes to promise future developments of specific inhibitors.

MR5. La deshidrogenasa de L-a-hidroxiácidos aromáticos de *Trypanosoma cruzi*: un nuevo miembro de la familia de las malato deshidrogenasas sin capacidad de reducir oxalacetato. NOWICKI C.

Fac. de Farmacia y Bioquímica, UBA, Buenos Aires, Argentina. cnowicki@criba.edu.ar.

El metabolismo de aminoácidos aromáticos en *Trypanosoma cruzi* presenta notorias diferencias con respecto al observado en los mamíferos. Este parásito posee una tirosina aminotransferasa (TAT) citosólica muy abundante, capaz de transaminar con similar facilidad aminoácidos aromáticos, alanina, metionina y leucina. Los derivados aromáticos del ácido pirúvico formados por la TAT son reducidos a los correspondientes derivados del ácido láctico por la deshidrogenasa de L-a-hidroxiácidos aromáticos (AHADH) dependiente de NADH. El parásito no utiliza las cadenas carbonadas de los derivados del ácido láctico formados por la AHADH, sino que excreta estos compuestos al medio de cultivo. La importancia metabólica de la AHADH parece estar vinculada con la necesidad de reoxidar NADH en el citosol. La expresión de esta enzima está regulada a lo largo del ciclo de vida del parásito, los niveles de AHADH son más elevados en las formas que se desarrollan en el insecto-vector que en los estadios presentes en el huésped mamífero. El gen que codifica para esta enzima se clonó mediante la combinación de técnicas tales como el screening inmunológico y reacciones de PCR. Se comprobó que la AHADH presenta aproximadamente un 68% de similitud en su secuencia de aminoácidos con malato deshidrogenasas citosólicas (MDHsc) de distintas plantas aunque también se destaca por su similitud con MDHsc de otros eucariotas. La enzima recombinante, purificada a partir de cultivos de *Escherichia coli*, presentó las mismas constantes cinéticas que la enzima natural. La AHADH, a

pesar de la similitud de su secuencia de aminoácidos con distintos miembros de la familia de deshidrogenasas de L-a-hidroxiácidos, es incapaz de reducir oxalacetato.

Estudios sobre la relación estructura-función de la AHADH mediante mutagénesis dirigida permitieron confirmar que la AHADH comparte con las MDHs el mecanismo de catálisis reconociéndose también, algunos de los residuos responsables de su especificidad de sustrato. Estos estudios sumados a los de modelado molecular permitieron aportar evidencias adicionales a favor de que se trata de un nuevo miembro de la familia MDHsc sin capacidad de reducir oxalacetato. Por otra parte, *T. cruzi* carece de la isoforma citosólica de MDH característica en la amplia mayoría de los organismos, presentando en cambio una isoforma glicosomal y otra mitocondrial. Las secuencias de aminoácidos de estas isoenzimas presentan poca similitud con la de la AHADH, tampoco se observa reacción inmunológica cruzada entre la AHADH y las MDHs del parásito. En la gran mayoría de los organismos, estas enzimas son claramente reconocidas como las responsables de mantener el balance redox entre las organelas y el citosol por medio del sistema de lanzaderas. La diferente distribución subcelular para las MDHs en el *T. cruzi* indica una distinta organización, en este parásito, de las lanzaderas que involucran a las MDHs. Es probable que *T. cruzi* haya adquirido la AHADH como resultado de un restringido número de mutaciones puntuales ocurridas en una MDHc que no le resultaba de utilidad debido a la presencia de las isoformas mitocondrial y glicosomal de MDHs sumadas a las características particulares del parásito en algunos aspectos de su metabolismo.

MR5. *Phytomonas* sp. Modelo Metabólico de Tripanosomátidos para el Diseño de Drogas Tripanocidas. UTTARO AD¹, MIRKIN N¹, ALTABE SG¹, RIDER, MH², MICHELS, PAM³, OPPERDOES FR³

¹IBR-Dto. de Microbiología, Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, Universidad Nacional de Rosario, Suipacha 531, 2000-Rosario, Santa Fe, Argentina. ²Research Unit for Hormone and Metabolism and ³Research Unit for Tropical Diseases, ICP, UCL, Av. Hippocrate 74, 1200-Brussels, Belgium. uttaro@infovia.com.ar.

El metabolismo energético de *Phytomonas* sp. fue previamente descrito. Este tripanosomátido, aislado de los tubos lactíferos de *Euphorbia characias*, presenta un metabolismo muy similar a la forma sanguínea de *Trypanosoma brucei*. En ambos casos la actividad mitocondrial está muy reducida. El ciclo de Krebs no es activo y carecen de una clásica cadena de transporte electrónico. La respiración es mediada por una glicerol fosfato oxidasa mitocondrial insensible al cianuro. Ambos tripanosomas son incapaces de respirar sobre prolina, 2-oxoglutarato o succinato y son altamente dependientes del metabolismo de carbohidratos en sus requerimientos energéticos. Poseen una glucólisis muy activa, cuyas enzimas se encuentran confinadas en una organela especializada, el glicosoma.

Nosotros hemos descrito previamente (Uttaro and Oppendoes, 1997, *Mol. Biochem. Parasitol.* **89**: 51-59) la presencia de dos isoformas de malato dehidrogenasa (MDH) en *Phytomonas* sp., una altamente específica presente en la mitocondria y una isoenzima glicosomal que representa el 80% del total de la actividad MDH y que es capaz de utilizar otros oxoácidos además de oxaloacetato. Aquí presentamos evidencias de que esta baja especificidad de sustrato de

la enzima glicosomal es debido a la presencia de una familia de genes de 2-hidroxiácido dehidrogenasas que copurifican en las condiciones utilizadas. Dos de estos genes fueron clonados, secuenciados y sobreexpresados en *E. coli*. Ambos presentan un 90.4% de identidad posicional a nivel de aminoácidos, pero solo uno presenta actividad enzimática con oxaloacetato (gMDH), mientras el otro (gHADH), es incapaz de reducir oxaloacetato pero sí otros oxoácidos aromáticos y alifáticos.

Para estudiar estos cambios de actividad enzimática, hemos hecho una serie de enzimas recombinantes entre ambos genes. La caracterización cinética de estas enzimas híbridas sobreexpresadas nos ha permitido identificar aminoácidos en el sitio activo, responsables de la especificidad de sustrato. Esta información podría ser utilizada en el diseño de inhibidores específicos de la malato dehidrogenasa glicosomal de tripanosomátidos. El rol metabólico de esta enzima es la reoxidación del NADH producido durante la glicólisis. En ausencia de esta reoxidación la glicólisis sería interrumpida, lo que convierte a la MDH en un buen blanco para el desarrollo de drogas tripanocidas.

MR5. Drug discovery in *Cryptosporidium parvum*: what we have learned From biochemical, molecular and phylogenetic analysis. ¹YARLETT N, RIORDAN CE, STEJSKAL F, ²LANGRETH SG, ³KAYSER O, ⁴UPTON SJ, LAGIER MJ, ZHU G, ⁵PHILIPPE H and KEITHLY JS.

Wadsworth Center, Albany, NY, USA Janet.Keithly@wadsworth.org. ¹Pace University, NYC, ²Uniformed Services University, Bethesda, MD, ³Free University, Berlin, Germany, ⁴Kansas State University, Manhattan, KS, ⁵University of Paris-South, Orsay, France.

Cryptosporidium parvum has been shown by phylogenetic reconstruction using large and small subunit rRNA genes and 6 proteins, to be the earliest emerging member of the Phylum Apicomplexa (Zhu et al 2000). In fact, *C. parvum* is a sister group to the gregarines (Carreno et al 1999) and more closely related to dinoflagellates than it is to any coccidian (*Toxoplasma gondii*) or haematozoan (*Plasmodium falciparum*). Therefore, it should come as no surprise that traditional anticoccidial and antimalarials have little or no effect upon this pathogenic protist which is a leading cause of death in AIDS patients and malnourished children (Fayer, 1997).

We have learned, for example, that unlike its mammalian hosts and nearest relatives, *C. parvum* has: (1 a plant-like polyamine biosynthesis by decarboxylation of arginine rather than ornithine (Keithly et al 1997); (2 a Type I cytosolic fatty acid synthase (FAS) rather than a Type II organellar FAS (Zhu et al 2000); (3 a fusion protein for pyruvate NADP⁺ oxidoreductase:cytochrome P450 reductase (PNO:CYR) that shares identity with a similar protein in the photosynthetic kinetoplastid *Euglena gracilis* (Rotte et al, unpublished) and homology with the pyruvate ferredoxin oxidoreductase (PFO) of amitochondriate protists; (4 an azide-, cyanide- and oligomycin-sensitive, acristate ribosome-studded mitochondrion posterior to the nucleus (Riordan et al 1999); (5 no plastid or its genome (Zhu et al 2000); and (6 a copper transporting heavy metal P1-ATPase (LaGier et al, unpublished). Although insensitive to both anticoccidials and antimalarials, this apicomplexan is sensitive to naphthoquinones and pyrones (Kaiser et al, unpublished), both known inhibitors of mitochondrial function. In addition, and perhaps unexpectedly, the mitochondrion-specific fluorescent dyes Rhodamine

B, Rhodamine 123, Mitotracker green FM, and DIOC₃ localized both to the mitochondrion and to the crystalloid body, an organelle whose function is completely unknown.

In an attempt to explore the potential as a drug target of the glycolytic pathway and of energy metabolism in this organism, we have recently identified and characterized 4 nucleus-encoded mitochondrial genes: Cpn60, Adenylate Kinase 2, Valyl-tRNA synthase, and PNO:CYR. With the exception of Cpn60, none of these has a typical mitochondrion targeting presequence, but phylogenetic analysis of all of these genes robustly places them within mitochondrial, rather than plastid, clades. Therefore, our current hypothesis is that these genes in *C. parvum*, like those of the amitochondriate protists *Entamoeba histolytica*, *Giardia lamblia*, and *Trichomonas vaginalis*, are remnants from a common α -proteobacterial ancestor. Based upon our knowledge of these genes, but especially that of the fusion gene PNO which unlike its homologue in *E. gracilis*, lacks a mitochondrial targeting sequence, we think that the mitochondrial and energy metabolism of *C. parvum* will have unique functions denoting a third type anaerobic protist metabolism, i.e. related to, but separate from, those of amoebids, diplomonads and trichomonads. Because the metabolism of *C. parvum* is so different from that of its host, and other apicomplexans, we think one or more the pathways discovered by us may well serve as new targets for chemotherapy against cryptosporidiosis, for which no treatment is currently known.

MR6: Situación vectorial en la Argentina

MR6. Vectores de Chagas. Situación actual en el país. BLANCO SB.

Coordinación Nacional de Control de Vectores. Ministerio de Salud de la Nación Argentina-soniablanco@arnet.com.ar.

Los ministros de Salud de los países miembros de la Iniciativa del Cono Sur (OPS-OMS) se comprometieron en 1991, a dar sustentabilidad y continuidad a los presupuestos y acciones de los Programas Nacionales de Control de la Enfermedad de Chagas, a fin de lograr la meta de la interrupción de la transmisión vectorial y/o transfusional de *T. cruzi*, en el camino hacia el objetivo final de eliminación del *T. infestans*, de las áreas endémicas. En este marco, el Programa Nacional de Control de Chagas (PNCCCh) en Argentina, inició formalmente una nueva estrategia de control basada en la horizontalización de las acciones con participación comunitaria y tecnología apropiada. Esta estrategia permitió en un corto plazo (92-99) rociar con insecticida en todo el país, el 97% de las viviendas de alto, moderado y bajo riesgo de transmisión (821.000 tratamientos químicos) e instalar vigilancia activa en el 82,24% de las mismas. Se estudiaron más de 450.000 niños menores de 15 años, de áreas endémicas bajo vigilancia entomológica, lo que permitió detectar los niños con infección chagásica y dar respuesta terapéutica inmediata. Los niños con infección comprobada fueron derivados al sistema de atención médica para su control y tratamiento. En 1993 se diseñó la estrategia de control de transmisión vertical, implementándose paulatinamente en las provincias. Se demostró que los niños con infección congénita pueden ser controlados exitosamente por medio de un programa específico inserto en los sistemas de salud, locales de las jurisdicciones provinciales. Todas estas acciones lograron un impacto importante reflejado en:

a) disminución marcada de los índices de infestación intra domiciliaria (6,11% en 1992 a 1,19% en 1999) en áreas bajo vigilancia, persistiendo aún zonas reducidas y puntuales de triatomismo domiciliario. b) En la disminución abrupta de los casos agudos por transmisión vectorial registrada en el país, de 200 casos en los años 90-92, a 6 casos en el 99. Con estos resultados el PNCCCh, para el año 2000, realizó un diagnóstico de situación para cada provincia del área endémica del país, que fue diferente según la etapa de control en que se encuentran. Lo que significó un tratamiento y necesidades distintas para cada caso. En base a estos considerandos se agruparon las provincias según tres situaciones o etapas diferentes de control: 1) siete provincias (Jujuy, Catamarca, Salta, Entre Ríos, La Pampa, Neuquén y Río Negro) con índices de infestación cercana a cero, cobertura de viviendas en vigilancia, del 100% del área endémica y sin detección de casos agudos vectoriales, por lo tanto en condiciones, en poco tiempo de certificar la interrupción de la transmisión vectorial de *T. cruzi*. 2) cinco provincias (Tucumán, Corrientes, Misiones, Santa Fe y Mendoza), con índices de infestación intra domiciliarios por debajo del 10%, con actividades de vigilancia discontinuas y sin ocurrencia de casos de Chagas agudo vectorial en los dos últimos años. 3) Siete provincias (Córdoba, Formosa, Santiago del Estero, La Rioja, Chaco, San Juan y San Luis), con zonas de riesgo de transmisión vectorial, y las cuatro últimas con áreas para tratamiento químico de ataque. Las provincias del punto 1- la primera condición para certificar la interrupción de la transmisión vectorial es garantizar que el sistema de vigilancia sea activo y permanente, con participación de la comunidad e involucrando las diferentes organizaciones y servicios de salud. El sistema debe estar sujeto a monitoreos periódicos por muestreo a través de la búsqueda activa del insecto, por personal especializado. La demostración de la interrupción de la transmisión vectorial, se hará a partir de la disponibilidad, análisis y entrecruzamiento de los siguientes datos: a- Indicadores entomológicos; (índices de infestación y colonización intra y peri domiciliarios por localidad, por *T. infestans*, infección natural por *T. cruzi*, y densidad triatómica), según protocolo. b- Indicadores de seroprevalencia en niños menores de cinco años, según protocolo. c- No ocurrencia de casos de Chagas agudo vectorial. Estos indicadores deben ser analizados en forma conjunta. Las provincias que están en el punto 2- con situaciones intermedias tanto de riesgo epidemiológico de transmisión, como del grado de cobertura de la vigilancia, deberán implementar acciones de control y vigilancia sostenidas y sostenibles en el tiempo, y completar estudios serológicos de base en niños menores de 15 años, en áreas bajo vigilancia. Las provincias del punto 3-, deberán realizar una urgente acción de tratamiento químico de las viviendas, con personal técnico, en aquellas zonas donde hay transmisión activa del *T. cruzi* y donde no se implementó aún un tratamiento químico de ataque; y consolidar la vigilancia en las zonas ya tratadas.

MR6. Vectores de leishmaniosis: Situación actual en el país. SALOMÓN OD.

CeNDIE, ANLIS, Argentina. danielsalomon@hotmail.com.

El primer brote de leishmaniosis mucocutánea (LMC) debidamente registrado en la Argentina en los últimos 60 años tuvo lugar a mediados de la década de 1980, en la Provincia de Salta, en las localidades de Pichanal y Embarcación (22° 30' to 24° 10' LS, 63° 10' - 64° 25' LO). En dicha ocasión la tasa de incidencia para la provincia se incrementó de 6.4 /

100,000 en 1984 a 28.7/100,000 en 1985. El parásito circulante fue identificado como *Leishmania (Viannia) braziliensis*. A partir de dicha fecha se registraron brotes epidémicos de LMC confirmados en 9 provincias endémicas: Catamarca, Chaco, Corrientes, Formosa, Jujuy, Misiones, Salta, Santiago del Estero y Tucumán. En 1998 Argentina registró 1,243 casos de LMC provenientes en su mayoría, de dos focos: 1) Porcelana-Carmelitas/Orán, Salta (23° 03' 27" LS, 64° 24' 29" LO), con una tasa de incidencia provincial de 96.1/100,000, y 2) Puerto Esperanza, Misiones (26° 00' 41" LS, 54° 35' 09" LO) con una tasa de incidencia provincial de 28.0/100,000. En 1999 el Ministerio de Salud de la Nación aprobó la constitución de un Programa Nacional de Leishmaniosis cuyo Manual de Procedimientos, consensuado en la Reunión previa de la SAP (Colón, 1999), se encuentra en la etapa de desarrollo final.

Desde 1985 el autor ha participado del estudio de 9 focos, 7 de ellos asociados con capturas de Phlebotominae, vectores potenciales de la LMC: Pichanal, Tartagal, Carmelitas (Salta), Concepción (Tucumán), Vedia (Chaco), Las Lomitas (Formosa) y Puerto Esperanza (Misiones). Se ha contado para ello con la participación de Elizabeth Córdoba (UNT), Flavia Krsticevic (UNM), María B. de Pascual (MS Chaco), Gustavo Rossi (UNMLP).

De los 57,176 phlebotominae identificados hasta el momento, relacionados a sitios donde ocurre transmisión de LMC, la abundancia relativa de *Lutzomyia intermedia* resultó del 93.8% a 100% en cada foco. Esta especie es prevalente en ambientes peridomésticos, asociados con bosque secundario, o con el bosque en galería modificado de los cursos hídricos.

En el NO *Lu. cortelezii* y *Lu. migonei* están ocasionalmente presentes en ambientes peridomésticos, mientras en el NE estas capturas espontáneas están representadas por *Lu. whitmani*, *Lu. shannoni*, *Lu. migonei* y *Lu. quinquefer*. *Lutzomyia punctigeniculata*, *Lu. fischeri*, *Lu. pessoai*, *Lu. misionensis*, *Lu. longipalpis*, *Lu. auraensis*, *Brumptomyia avellari*, *Br. guimaresi*, *Br. pintoi* también se encontraron en capturas menos abundantes, principalmente asociadas a monte primario o a situaciones especiales (p.e. *Brumptomyia* en trampas de luz). Por lo tanto, en estas capturas recientes se han identificado 15 especies, 6 nuevas para el país, no registrándose capturas, hasta ahora, de *Lu. alphabetica*, *Lu. monticola*, *Lu. sordelli* ni *Lu. pascalei*, descritas para Argentina con anterioridad a 1950.

Lutzomyia longipalpis, hasta hoy sólo capturada en Misiones, con presencia muy probable también en Formosa, es vector de *L.(L.) chagasi*, agente de la leishmaniosis visceral, parásito no identificado hasta el momento en el país, pero presente en Paraguay y en estados del sur de Brasil. *Lutzomyia intermedia* tiene una distribución en el tiempo y el espacio consistente con su posible papel en la transmisión peridoméstica. Esta especie, además, ha sido incriminada como vector de *L.V. braziliensis* en varios focos del Brasil. Sin embargo, la gran abundancia de *Lu. intermedia* no implica que esta deba ser el vector primario, aunque en consideración a su competencia y capacidad vectorial, se puede inferir algún papel de la misma, al menos en la amplificación de los brotes una vez que el parásito es introducido por los reservorios y vectores adecuados en la población susceptible (hombres, cánidos, equinos). Luego, teniendo en cuenta los resultados entomológicos y epidemiológicos, se puede suponer que los brotes de LMC en Argentina tienen lugar por: 1) condiciones meteorológicas excepcionales - transmisión peridoméstica. 2) Deforestación- transmisión tradicional en bosque y activi-

dades relacionadas. 3) Asentamientos humanos próximos a bosque primario residual. Se han desarrollado diseños experimentales de control para cada uno de estos escenarios.

MR6. Herramientas de control de vectores. ZERBA EN.

Centro de Investigaciones de Plagas e Insecticidas (CITEFA-CONICET). Buenos Aires. Argentina. ezerba@citefa.gov.ar.

Los insectos de importancia sanitaria con mayor incidencia actual en la salud pública de la Argentina son la vinchuca (*Triatoma infestans*), transmisor de la enfermedad de Chagas y el mosquito *Aedes aegypti*, vector del Dengue. Ambos vectores tienen marcadas diferencias en su biología y ecología, las que se reflejan en las enfermedades que transmiten. El Chagas es rural y asociado a la pobreza mientras que el Dengue es urbano y no distingue clases sociales. Estas diferencias afectan a las prioridades y dan lugar a distintas herramientas de control. El desarrollo de herramientas para controlar ambos vectores, es una necesidad sanitaria. El control de vinchuca se basa en rociados con formulaciones insecticidas residuales. El *Aedes aegypti* tiene un ciclo de vida urbano. Su control se lleva a cabo mediante aplicación de larvicidas en aguas y tratamientos espaciales con adulticidas. El pote fumígeno CIPEIN PF-7 ha demostrado, en estudios de laboratorio y campo, ser una herramienta dual para tratamientos de interiores de viviendas rurales y urbanas, eficaz en el control de *Aedes aegypti* y *Triatoma infestans*. El isómero cis de la permetrina es una molécula de alta eficacia en vinchuca como floable y en *Aedes* como ULV. Estos desarrollos producidos en la Argentina abren posibilidades para contar con herramientas aplicables al control de ambos vectores.

MR7: Diagnóstico y control de las infecciones virales

MR7. Dengue: diagnóstico y vigilancia. AVILES G.

Instituto Nacional de Enfermedades virales humanas "Dr. JI Maiztegui" (INEVH-ANLIS), Centro Nacional de Referencia de Diagnóstico de Dengue/Centro Colaborador OPS/OMS, Pergamino, Argentina. gabrielaaviles@hotmail.com.

El Dengue (DEN) es una enfermedad viral aguda producida por cualquiera de los 4 serotipos: DEN-1,2,3 o 4. La clínica se confunde fácilmente con otros síndromes febriles. La transmisión local de DEN en la Argentina se ha incrementado por la presencia de *Aedes aegypti* (vector del DEN) en las regiones templada y subtropical, y por los recientes brotes en los países limítrofes. Desde 1995 se estableció un sistema de vigilancia activa basado en el laboratorio, que incluye a todas las provincias expuestas a riesgo y el INEVH es el Centro Nacional de Referencia. A nivel local se realiza el screening de anticuerpos IgM en casos clínicamente sospechosos y las muestras se envían al INEVH para confirmación por técnicas de ELISA, Neutralización en cultivos celulares, Inhibición de la Hemoaglutinación, aislamiento viral e inmunofluorescencia y PCR. El objetivo primordial del diagnóstico de laboratorio es la vigilancia proactiva para poder adoptar las medidas necesarias de prevención y control. Hasta el presente se han detectado 760 casos de DEN: 136 fueron importados de otros países, 494 fueron autóctonos y de otros 130 casos no disponemos de datos epidemiológicos. Al menos 2 serotipos de DEN (1 y 2) han

sido localmente transmitidos en el Norte de Argentina en distintas áreas, lo cual incrementa el riesgo de formas severas de DEN en el futuro.

MR7. Síndrome pulmonar por Hantavirus. PADULA P.

Dto. Virología. INEI. ANLIS "C. G. Malbran". Buenos Aires. ppadula@cvtci.com.ar.

Los hantavirus están distribuidos en todo el mundo y representan un problema de salud pública como agentes causales de fiebre hemorrágica con síndrome renal (FHSR) en Asia, de una forma atenuada conocida como nefropatía epidémica en distintas regiones de Europa y Asia y del Síndrome Pulmonar por hantavirus (SPH) en las Américas. Los hantavirus poseen un genoma ARN monocatenario trisegmentado de polaridad negativa y se mantienen en la naturaleza en reservorios roedores específicos.

Hasta el primer semestre del año 2000, se confirmaron en Argentina 317 casos de SPH y más de 500 casos entre los seis países de Sudamérica que reportaron casos. La tasa de mortalidad fue del 70% para los primeros casos llegando al 30% para los brotes más recientes. Si bien el aumento del número de casos de SPH puede deberse al mayor conocimiento por parte de la comunidad biomédica y al desarrollo de reactivos diagnósticos, también cambios climáticos, el incremento de la agricultura, la construcción de represas o un mayor contacto con los reservorios podrían dar cuenta de este incremento. En general esta enfermedad está restringida a áreas geográficas específicas de acuerdo a la distribución del reservorio.

Cada hantavirus se perpetúa en la naturaleza en una única o pocas muy relacionadas especies de roedor. En estos reservorios la infección parece no tener efectos deletéreos y el virus persiste durante largos períodos, probablemente de por vida, en presencia de una fuerte presencia de anticuerpos. Durante la fase aguda de la infección que dura de 3 a 4 semanas, es donde la viremia alcanza sus mayores valores entre los días 7 a 14. La transmisión entre roedores es horizontal presentando una mayor prevalencia los animales de más edad. La transmisión vertical no contribuye a la dispersión del virus. En algunas especies la proporción de infectados es mayor en los machos y se la ha relacionado con la presencia de mordeduras. La aparición de casos humanos se ha asociado con cambios en la densidad de roedores. Esta densidad y la proporción de infectados varían fuertemente según las estaciones y de año en año. Factores como competencia interespecífica, cambios climáticos, predadores y la intervención del hombre en talas o desmontes, introducción de especies exóticas o cambios en la agricultura y urbanización podrían alterar la dinámica poblacional de los roedores. La transmisión del roedor al ser humano, que es un huésped accidental, se produce principalmente por aerosoles aunque eventualmente las mordeduras pueden causar infección. La exposición al virus ocurre en lugares cerrados, como galpones o depósitos infestados por roedores, por trabajo agrícola, actividades en áreas endémicas como ejercicios militares o campamentos.

Los estudios de seroprevalencia en Sudamérica mostraron porcentajes mayores que los encontrados en el Norte con valores de hasta 30%. La transmisión persona a persona se ha demostrado en la Patagonia únicamente. Hasta la fecha en Argentina se han registrado 5 linajes diferentes de virus Andes que afectan al humano, una en la zona sur andino patagónica, tres en la zona central, uno de los cuales se encontró en Uruguay, y otro en la zona norte, Salta

y Jujuy. Al menos dos linajes diferentes se encontraron en Paraguay. De los roedores estudiados a la fecha solo los del género *Oligoryzomys* son los involucrados en la transmisión al ser humano en Argentina. Cuando se compara la filogenia de los roedores y la de los hantavirus que los infectan, se observa que a mayor parentesco de los roedores se corresponde una más estrecha relación de los virus que los infectan. Este hecho ha sido considerado una fuerte evidencia de que estos virus han coevolucionado con sus huéspedes durante millones de años. Sin embargo se ha observado en Argentina que es posible hallar más de una especie de roedor portando el mismo linaje viral, así como también que una especie de roedor sea huésped de más de un genotipo viral, dependiendo de la zona geográfica considerada.

El laboratorio de hantavirus del INEI-ANLIS «Dr. C. G. Malbrán» capacita en el diagnóstico de hantavirus a aquellos países que inician la investigación epidemiológica y a las provincias argentinas que reportan casos con frecuencia continua. Se efectúa el control de calidad de los laboratorios integrantes de la red y se confirman los diagnósticos realizados en los centros capacitados.

MR7. Red de Hepatitis Virales. VLADIMIRSKY SN, GONZALEZ JE.

Servicio Hepatitis y Gastroenteritis, Dto Virología, Laboratorio Nacional de Referencia, Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas, ANLIS "Dr. C. G. Malbrán", Buenos Aires, Argentina. svladimirsky@anlis.gov.ar / jegonzalez@anlis.gov.ar.

Esta Red forma parte de una de las estrategias del Programa Nacional de Control de Hepatitis Virales (PNCHV), que se inicia en el año 1992, con tres objetivos principales: 1.-Epidemiológico, 2.-Prevención y 3.-Tratamiento. La Red de Unidades Centinela Regionales (UCR) está formada por 10 UCR cada una con un coordinador Bioquímico y un coordinador Médico que en total comprenden 14 centros ubicados en 9 jurisdicciones. El Grupo de Trabajo (GT) participante en la reunión anterior centró su discusión en torno a cuatro temas : 1.-regionalización, 2.-aportes al SINAVE, 3.-supervisión y 4.-reactivos. (Medicina, Bs As, vol. 59 Sup III : 36-37, 1999).

Se discute a continuación lo actuado desde entonces y lo proyectado para un futuro inmediato en relación a dichos temas.

1.- Regionalización : De acuerdo a las conclusiones del GT, se trabajó en el armado de una red de alcance nacional, cubriendo las 24 jurisdicciones, mediante la conformación de una Red de Unidades Centinela Provinciales (UCP). Para ello se realizó una encuesta con los referentes de Redes de cada jurisdicción, para comenzar a incorporar el componente de laboratorio de la Unidad (LCP). Afortunadamente se obtuvo una respuesta inmediata de intención a incorporarse al PNCHV y con buen nivel en cuanto a recursos humanos (RRHH) y capacidad tecnológica en prácticamente todas las jurisdicciones. Esta primera etapa está cumplida para 22 de las 24 jurisdicciones. Con la incorporación del componente médico asistencial en una etapa inmediata posterior, se tendrá conformada la Unidad y así la red de Unidades Centinela Provinciales (UCP). Esto permitirá eficientizar las acciones atendiendo a las circunstancias locales en relación a realidades epidemiológicas, sanitarias, y administrativas. 2.- Aportes al SINAVE : De la lectura del último Boletín Epidemiológico Nacional (1999) se desprende que continúan las dificultades en la recopilación de datos y

existe una subnotificación de la patología en varias jurisdicciones. Es nuestra intención cambiar esta situación cuando en cada jurisdicción funcione una UCP ya que se contará con un interlocutor capacitado para interpretar y mejorar las notificaciones con las autoridades epidemiológicas locales y nacionales. 3.- Supervisión a) directa : sigue siendo dificultosa por razones presupuestarias aunque vale recordar que las designaciones en el caso de los LCP fue realizada a instancias de los responsables locales. b) indirecta Los LCP serán invitados a incorporarse al Programa de Control de Calidad en serología de Hepatitis B (HBV) y C (HCV) (PCC) que lleva a cabo el Laboratorio Nacional de Referencia desde Octubre de 1996 a través de la distribución de paneles (P) caracterizados para HBV (HBsAg y antiHBc) y HCV (antiHCV). Se han producido y distribuido desde la última reunión 2 P (P7 : Oct 99 y P8 : Abril 00), con un número creciente de participantes (50 en P6, 53 en P7 y 57 en P8). La creciente demanda espontánea por parte de numerosos laboratorios y/o Bancos de sangre, pone de manifiesto la necesidad e importancia de la continuidad de este programa. 4.-Reactivos : La encuesta realizada para los LCP reveló entre otras, que la provisión de reactivos es dificultosa en muchos de ellos sobre todo respecto a la continuidad. Sin embargo, debe hacerse incapié en que la estructura local de cada una de las jurisdicciones es quien debe asegurar la provisión de insumos para el funcionamiento de los laboratorios y la estructura nacional es quien ayudará periódicamente con aportes puntuales. Se han iniciado gestiones con las nuevas autoridades de Salud para la consolidación del Programa en la obtención de recursos que permitan financiar las actividades propuestas y otras que surjan del accionar propio del PNCHV.

MR8: Organización genómica y expresión en parásitos

MR8. Secuenciación de GSSs en *Trypanosoma cruzi*. AGÜERO F, VERDUN RE, FRASCH ACC, SANCHEZ DO.

Instituto de Investigaciones Biotecnológicas - Instituto Tecnológico de Chascomús, Universidad Nacional de General San Martín - CONICET, San Martín, Provincia de Buenos Aires, Argentina. fernan@iib.unsam.edu.ar

A partir de ADN genómico de *Trypanosoma cruzi*, el agente de la enfermedad de Chagas, se realizó un muestreo del genoma por secuenciación al azar. Se obtuvieron 11,459 lecturas, que corresponden a 4.3 Mb de secuencia útil, o aproximadamente el 10 % del genoma haploide del parásito. El contenido de GC total estimado fue de 50.9%, con una alta representación de di- y tri-nucleótidos de adenina y timina. De los 5,000 genes estimados se identificaron 947 posibles nuevos genes. Otras 1,723 secuencias corresponden a genes previamente identificados a través de secuenciación de ESTs. 7,735 secuencias no presentaron homologías significativas en bases de datos, pero la presencia de marcos abiertos de lectura sugiere que algunas de ellas podrían contener ADN codificante. Estos resultados nos permitieron realizar una caracterización general del genoma de *T. cruzi*, identificar posibles nuevos genes y definir grandes familias de genes y de elementos repetitivos, incluyendo un nuevo elemento repetitivo y secuencias abundantes no caracterizadas previamente.

MR8. Descubrimiento de genes del *Trypanosoma cruzi* a partir de la secuencia de su genoma. Caracterización de las Ciclofilinas y de una Glutarredoxina como posibles blancos quimioterapéuticos. RUIZ AM, BUA J, GARCIA G.

Instituto Nacional de Parasitología "Dr. M. Fatała Chabén". ANLIS Dr. C. Malbrán", Buenos Aires Argentina, aruiz@interlink.com.ar

Con el objeto de caracterizar nuevos genes que codifican para posibles blancos para la quimioterapia de la enfermedad de Chagas, se utilizó la información generada por la secuenciación al azar de clones de ADNc (ESTs) en el Proyecto Genoma del *Trypanosoma cruzi*. Se seleccionaron clones cuya secuencia presentó homología con ciclofilinas, moléculas que catalizan la isomerización entre las dos conformaciones de prolina en las proteínas, y se unen a la ciclosporina A, un péptido con actividad inmuno-supresora. También se seleccionaron clones de ADNc con homología con enzimas del metabolismo del glutatión, sin contraparte en el hospedador mamífero. Se estudiaron catorce ESTs que codificaron para siete genes de ciclofilinas en el parásito y dos ESTs codificantes para una proteína que se denominó TcGRX por presentar homología con glutaredoxinas bacterianas y con las clases más ancestrales de glutatión-S-transferasas. Todos estos genes fueron localizados en bandas cromosomales del parásito separados por electroforesis en campo pulsado, reconociendo cada gen a dos cromosomas probablemente homólogos. Las secuencias proteicas deducidas a partir de la secuencia de ADN de las ciclofilinas muestran que son altamente conservativas con las ciclofilinas de otros organismos. Los residuos para la actividad enzimática y la actividad de los posibles inhibidores también se encuentran conservados. La proteína recombinante de uno de esos genes, TcCyp18, fue expresada en bacterias y demostró tener actividad de peptidil proil *cis trans* isomerasa, que fue inhibida por la ciclosporina A con una IC₅₀ de 18.4± 0.8 nM. Debido a que la ciclosporina A ha demostrado una marcada actividad antiparasitaria en el *T. cruzi* y otros organismos se encuentra en experimentación la actividad de derivados no inmunosupresores de la ciclosporina A *in vivo* e *in vitro*, la identificación de sus moléculas blanco en el parásito y la elucidación de su mecanismo de acción.

El gen completo de la TcGRX se obtuvo por hibridación de uno de los EST a una genoteca de *T. cruzi* realizada en cósmidos, obteniéndose un marco abierto de lectura de 936 pb codificando una proteína de 312 aa con el patrón completo de glutaredoxinas y un sitio activo conteniendo dos cys (CPFC). Los ensayos de hibridación sugieren que los genes TcGRX y TcCyp18 estarían presente en una copia única por genoma haploide del parásito. La comparación de la secuencia de TcGRX en el banco de datos de estructuras tridimensionales (pdb) permitió seleccionar a la Grx 3 de *Escherichia coli* como templado para realizar el modelado molecular de la proteína de *T. cruzi*. El análisis del modelo permitió identificar la estructura típica de la familia tioredoxina/glutarredoxina. La expresión de la TcGRX y de los otros seis genes de ciclofilinas, el análisis de su actividad enzimática y la búsqueda de posibles inhibidores de dicha actividad, definirán su rol en el metabolismo del parásito y su utilidad como nuevos blancos de drogas tripanocidas.

MR8. Expresión diferencial de genes durante el desarrollo de *Echinococcus granulosus*. EHRLICH R, AGORIO A, CASTILLO E, CHALAR C, ESTEVES A, MARTÍNEZ C.

Sección Bioquímica. Instituto de Biología. Facultad de Ciencias. Universidad de la República. Iguá 4225. 11500. Montevideo. Uruguay. ehrlich@fcien.edu.uy

En el marco del estudio de las bases moleculares del desarrollo y la adaptación al hospedero del parásito *Echinococcus granulosus*, hemos clonado y caracterizado una serie de genes, cuya expresión en distintos estadios del parásito (forma larvaria o protoescólex, membrana germinativa, adultos infértiles) ha sido analizada mediante una serie de abordajes diversos: Northern y Western blots, hibridaciones *in situ*, reacciones inmunohistoquímicas para microscopía óptica y microscopía electrónica de transmisión. De esta manera se han generado marcadores moleculares que permiten abordar el desciframiento de cascadas regulatorias durante el desarrollo de *E. granulosus*.

Cuatro genes se han estudiado con mayor detalle: *EgHbx2*, *EgHbx3*, *EgFABP1* y *EgTRX*. *EgHbx2* y *EgHbx3* codifican para proteínas con homeodominio, factores transcripcionales implicados en procesos de regulación del desarrollo en metazoarios. Su estudio, conjuntamente con el de otros genes con homeobox (*EgHbx1-11*) aislados en nuestro laboratorio (éstos incluyen genes del tipo Hox), se orienta a profundizar en los principios fundamentales del crecimiento, morfogénesis e innovación morfológica durante la evolución, dada la particular ubicación filogenética de este cestode. *EgHbx2* se expresa en los núcleos de las células que rodean a algunos corpúsculos calcáreos de los protoescólices. Mediante procedimientos de doble marcado (inmunolocalización y TUNEL) se puso en evidencia la colocalización de procesos apoptóticos y *EgHbx2* en dichas células. Actualmente se están llevando a cabo estudios para determinar la participación de *EgHbx2* en la decisión apoptótica de la célula y en la biogénesis de los corpúsculos calcáreos. En el estadio adulto, *EgHbx2* se expresa en la capa muscular subtegumentaria. La expresión de *EgHbx3* está restringida a nivel de los pedúnculos de los protoescólices y en los testis del estadio adulto.

EgFABP1, proteína transportadora de ácidos grasos, presenta una expresión diferencial durante el desarrollo en *E. granulosus*, expresándose a nivel subtegumentario en la larva metacestode y en zonas de proliferación celular de la membrana germinativa. Este parásito es incapaz de sintetizar *de novo* sus propios ácidos grasos, por lo que *EgFABP1* podría cumplir un rol clave en la internalización y transporte intracelular de ácidos grasos provenientes del huésped. Finalmente, en relación a *EgTRX* cabe mencionar que el sistema tioredoxina (tioredoxina: Trx, tioredoxina reductasa: TR y NADPH) participa en el mantenimiento de la homeostasis redox celular, acoplado al poder reductor del NADPH al intercambio reversible tiol-disulfuro. En organismos parásitos esta cascada puede operar, además, como defensa frente al estrés oxidativo impuesto por el hospedador. El estudio de la expresión de *EgTrx* ha permitido definir territorios celulares en los protoescólices.

Apoiado por CSIC, CONICYT, PEDECIBA, IFS, SAREC.

MR9: Transmisión y control de parasitosis

MR9. Estado actual de la infección por parásitos intestinales en Argentina. BASUALDO JA.

Cátedra de Microbiología y Parasitología, Fac. Cs. Médicas, (UNLP) La Plata, Argentina. abasua@atlas.med.unlp.edu.ar.

Las infecciones parasitarias intestinales están ampliamente distribuidas en el mundo y también en nuestro país. La frecuencia de personas infectadas con parásitos intestinales en el mundo es la siguiente: *Ascaris lumbricoides*: 1.472 millones; uncinarias: 1.298 millones; *Trichuris trichura*: 1.049 millones; *Entamoeba histolytica/dispar*: 500 millones; *Giardia lamblia*: 200 millones; *Taenia saginata*: 77 millones; *Taenia solium*: 10 millones; *Hymenolepis nana*: 75 millones; *Diphyllobothrium latum*: 9 millones; *Strongyloides stercoralis*: 70 millones; *Fasciola hepática*: 2,5 millones y *Enterobius vermicularis*: 400 millones. La mortalidad por año es de 60.000 personas para ascariosis, 65.000 para uncinariosis, 10.000 para trichuriasis y 100.000 para amebiosis.

Los parásitos llegan al suelo y/o a los cauces de agua por las siguientes vías: a) excretas humanas eliminadas en los inodoros; b) excretas humanas eliminadas al medio; c) construcción de letrinas sobre acequias; d) vertido del contenido de pozos ciegos intencional o por inundaciones; e) destrucción de redes cloacales; f) contaminación de pasturas y cultivos hortícolas a causa del empleo de abono fecal; g) arrastre de los elementos parasitarios por las lluvias a los cursos de agua o en el suelo.

Los huevos y quistes de parásitos intestinales vuelven a nosotros por las siguientes vías: 1) por agua contaminada, 2) por piel, 3) por transmisión fecal-oral directa, 4) por verduras-frutas mal lavadas, 5) por manipuladores de alimentos sin higiene adecuada, 6) por los zapatos, transportadores y procesadores de la materia fecal de la calle, 7) por artrópodos coprozoicos.

Con el objetivo de conocer la frecuencia y localización de los parásitos intestinales en Argentina, se realizó un estudio multicéntrico con la participación de hospitales públicos e Instituciones privadas del país en 1995. El total de hombres estudiados fue de 560 y el de mujeres 594. Mediante el estudio coproparasitológico seriado, en fresco y escobillado anal se detectó una o más especies de parásitos en el 57% de los estudiados. Los tres parásitos más frecuentes fueron: *E. vermicularis*, *G. lamblia* y *B. hominis* y con un porcentaje inferior al 10% *H. nana*, *A. lumbricoides*, *S. stercoralis*, uncinarias, *Taenia spp.*, *E. histolytica* y amebas no histolytica/dispar.

La información de la ciudad de Comodoro Rivadavia (Hospital Regional) indica que el 21,6% de las determinaciones coproparasitológicas fueron positivas siendo los parásitos más frecuentes *E. vermicularis*, *G. lamblia* y *B. hominis* y con un porcentaje inferior del 10% *E. histolytica*, *A. lumbricoides*, *H. nana* y amebas no histolytica/dispar (período 1998-2000). El Hospital Roca de Río Negro ha informado positividad en el 33% de las determinaciones coproparasitológicas siendo los parásitos más frecuentes *B. Hominis*, *E. vermicularis* y *G. lamblia* y con un porcentaje inferior al 5% *H. nana*, *A. lumbricoides*, *T. trichiura* y *Taenia sp* (período 1999-2000).

Se efectuó una recopilación de las comunicaciones y publicaciones nacionales para obtener información preliminar de la prevalencia de las parasitosis intestinales en poblaciones de Argentina. Los resultados han sido los siguientes: sobre un total de 1505 niños menores de 14 años de áreas urbanas, suburbanas, rurales e isleñas de 11 provincias los porcentajes de positividad variaron entre el 35% y 92% siendo los parásitos más frecuentes *B. hominis*, *E. vermicularis* y *G. lamblia*.

Los trabajos recopilados (comunicaciones, publicaciones y comunicaciones personales) han permitido obtener una

carta geográfica preliminar de Argentina referida a la localización de los parásitos intestinales en las provincias junto con los porcentajes mínimos y máximos de cada especie. Se han detectado 17 especies parasitarias intestinales en 16 provincias siendo los porcentajes máximos superiores al 50% para uncinarias (Misiones), *B. hominis*, (Corrientes), *G. lamblia*, (Buenos Aires), *E. coli*, (Misiones), *E. vermicularis*, (Buenos Aires) y los inferiores al 10% para *Taenia sp.* (Capital), *Cryptosporidium spp.* (Buenos Aires) *I. belli* (Corrientes), *B. coli* (Corrientes) y *C. cayetanensis* (Córdoba). Los porcentajes mínimos inferiores al 6% fueron para 17 especies parasitarias detectadas.

MR9. Situación actual de la transmisión y control de leishmaniosis, paludismo y Chagas en Paraguay. RUSSOMANDO G.

Ministerio de Salud Pública y Bienestar Social - SENEPA. Asunción-Paraguay.

ENFERMEDAD DE CHAGAS

En Paraguay la enfermedad de Chagas es una patología transmisible de gran relevancia para la salud pública. Alrededor de 600.000 habitantes se encuentran infectados por el *Trypanosoma cruzi*, y la dispersión territorial del *Triatoma infestans*, el principal vector del Paraguay, tiene alcance nacional. Entre los años 1981 a 1985 se realizaron levantamientos triatomínicos en 14 departamentos de la región oriental, en donde se han evaluado 2372 viviendas y 2795 *T. infestans*. El porcentaje de infestación para esta encuesta fue del 14% (370/2732) y el índice de infección natural en triatomínicos del 11%. En el año 1996 se realizó un estudio en conscriptos (grupo etáreo entre 15 y 18 años de edad) provenientes de todo el país, con un promedio general de seroprevalencia del 3,9 %, alcanzando en algunos departamentos como Boquerón (Región Occidental o Chaco), Cordillera y Paraguari (Región Oriental) hasta un 13,8%, lo que refleja que aún persiste el riesgo de infección en el Paraguay.

Estudios serológicos realizados en 38.438 mujeres durante el control prenatal, en más de 40 servicios sanitarios de dos departamentos endémicos Cordillera y Paraguari desde julio de 1995 hasta diciembre de 1999, ha permitido detectar 5.191 mujeres seropositivas para *T. cruzi*, demostrando una seroprevalencia de infección chagásica del 15,5% y 13%, respectivamente. Se han detectado en algunos distritos seroprevalencias muy elevadas, hasta 30%, de infección en mujeres en edad fértil. El impacto social de la enfermedad de Chagas en estos dos departamentos, se ve reflejado en el hecho que se detectan alrededor de 1500 mujeres seropositivas por año, se estima que unas 8000 mujeres de 15 a 45 años estarían infectadas, de las cuales más de 1000 sufren o sufrirán a corto plazo problemas cardiológicos y alrededor de 150 infantes por año padecerían de la enfermedad de Chagas por transmisión congénita (frecuencia de transmisión congénita del 7 al 10%), tan solo en dos departamentos endémicos. En septiembre de 1999, se ha realizado el levantamiento entomológico en 41.308 viviendas del Dpto. Cordillera y 53.575 viviendas del Dpto. Paraguari. Las tasas de infestación a nivel departamental fueron de 1,2% y 2,3% respectivamente, se han rociado en forma selectiva 5.500 viviendas en Cordillera y 12.000 viviendas en Paraguari, se capturaron 3.092 y 6.127 triatomínicos, respectivamente. La colonización domiciliar a nivel distrital alcanzó niveles del orden de hasta un 55%. Además del *T. infestans* se han capturado otros triatomínicos, *Pastronylus sp*, *T. sordida* y *T. guasú*.

LEISHMANIOSIS

La leishmaniasis tegumentaria es endémica en gran parte de la región Oriental del país, constituyendo una problemática netamente rural. Tomando como base el número de casos registrados, que va entre 400 a 800 casos por año, se estima que el número total de casos oscila anualmente entre 4000 a 8000, según cálculos técnicos de OMS. La problemática más grave constituye el alto porcentaje (33,5% para 1999) de casos con metástasis mucosa registrados. La leishmaniasis visceral constituye una enfermedad grave y recientemente detectada en el Gran Asunción, en los últimos 3 años se han diagnosticado 550 perros, con una prevalencia del 9% en algunos distritos del Departamento Central.

PALUDISMO

En el Paraguay en los años 60 el promedio de casos de paludismo era de 20.000 por año y su distribución abarcaba el 90% del territorio Nacional, a partir de los años 90 el número de casos bajó a promedios de 1.000 casos anuales. Desde el punto de vista geográfico el paludismo en el Paraguay es considerado como una endemia residual circunscrita a unos 50 distritos en todo el país. El 70% de los casos corresponden a las zonas aledañas a los lagos originados como consecuencia de la hidroeléctrica de Itaipú. Desde el año 1998 el país se había considerado en brote epidémico, durante el año 1999 fueron confirmados por laboratorio 8.724 casos, la búsqueda activa de casos en zonas endémicas demostró el subregistro que existía en años anteriores, la infección es causada principalmente por el *Plasmodium vivax*.

MR9. Leishmaniasis tegumentaria canina en focos de transmisión en Salta. BASOMBRI MA, PADILLA M, MARCO D, DIOSQUE P, MORA MC, FERNANDEZ M* y MALCHIODI E*.

Laboratorio de Patología Experimental, Fac. de Ciencias de la Salud, UN Salta e *Inst. Est. Inmunidad Humoral, FFyB, UBA. basombri@ciunsa.edu.ar

Desde la primera década del siglo XX, Patterson describió la Leishmaniasis Tegumentaria en la franja selvática tucumano-oranense. Terminado el siglo, siguen observándose focos endémicos en los desmontes y casos avanzados de espondia en los hospitales del NOA. Cecilio Romaña (An Inst Med Reg, Tucumán, 2: 283, 1949) hizo detalladas descripciones de la enfermedad en perros. El interés en la endemia canina trasciende el ámbito veterinario, ya que los perros pueden brindar datos epidemiológicos de relevancia para la endemia humana. Es de interés averiguar si actúan como centinelas de infección o como reservorios y también si sirven para la evaluación de vacunas y medidas profilácticas. Habiendo trabajado anteriormente en la vacunación de perros contra *T. cruzi*, nos interesó conocer algunos parámetros de base para la eventual prevención de la Leishmaniasis canina en Salta. El área de estudio comprendió los focos de alta transmisión identificados en los Departamentos de Orán y San Martín. A los datos clínicos y parasitológicos pudimos agregar estudios serológicos, incluyendo el uso de un antígeno de *Leishmania* (F45) y otro específico de *T. cruzi* (163B6), que resultó de utilidad para distinguir la infección chagásica, otra endemia canina y humana de la misma zona. El seguimiento "longitudinal" de perros enfermos y sanos durante un promedio de 309 días, nos indicó que la mayoría de las úlceras permanecen sin cicatrizar por tiempos prolongados. Se observaron aparentes curas en sólo un 13% (3/23) y progresión o compromiso

mucocutáneo en un 26% (6/23) de los casos. Entre 52 perros seronegativos y sin lesiones, residentes en la zona de riesgo, 6 (19%) desarrollaron lesiones y 10 (19.2%) sufrieron seroconversión. En base a estos datos se pudo estimar en los focos una incidencia anual de 22.7% para infección y de 13.5% para enfermedad. La cantidad de parásitos en las lesiones fue mucho más escasa que en casos humanos, siendo necesario un tiempo de observación de los preparados 6 veces mayor para llegar al diagnóstico positivo. Es quizás por esta razón que no hemos podido cultivar ni caracterizar aún aislados de perros. Pero varios aislados humanos de la zona han sido clasificados como *L. b. brasiliensis* (Campanini AR y cols. Medicina 53, supl. 1, 1993) y en otras regiones endémicas para este parásito se ha comprobado que los aislados humanos y caninos son homólogos (Cuba CA y cols. Trans Roy Soc Trop Med Hyg 79: 500, 1985). La seropositividad estuvo claramente asociada a los perros con lesiones y a la región de focos endémicos. En conclusión, el perro parece ser un huésped altamente susceptible al desarrollo de Leishmaniasis Tegumentaria. Su posible papel de reservorio de transmisión no parece radicar en la carga parasitaria de las lesiones sino en el largo tiempo durante el cual las úlceras están expuestas a la picadura de los insectos vectores. Estas observaciones indican que el control serológico y clínico de perros convivientes con comunidades humanas en zonas de riesgo, puede brindar un parámetro consistente para evaluar medidas preventivas, incluida la vacunación. Trabajo financiado por CONICET y CIUNSA. Agradecemos la colaboración de los Dres N. Taranto, N Mercuri, L Canini y A Marinconz.

MR9. Consideraciones sobre la transmisión congénita de *T. cruzi*. SEGURA EL.

ANLIS/ CeNDIE/FATALA CHABEN, Buenos Aires, Argentina. esegura@interlink.com.ar.

La organización de iniciativas entre países para el control de la infección por *Trypanosoma cruzi* adquirida por transmisión vectorial y transfusional, ha creado un nuevo perfil epidemiológico de la enfermedad de Chagas, desde el Río Grande en la frontera Norte de México, hasta el sur de Argentina y Chile. Resultados de la iniciativa del Cono Sur, indican que se puede conseguir un fuerte impacto sobre la incidencia de Chagas agudo. Por ello la vía de transmisión congénita, connatal o por la leche materna, emerge con nueva importancia, en la consideración de las medidas sanitarias a tomar para enfrentar el control de la ocurrencia de nuevos casos de Chagas. La gravedad de los casos congénitos cambió positivamente, después de 20 años de las acciones de control vectorial. Antes de este periodo, se publicaron elevados índices de mortalidad neonatal, en Argentina, Brasil y Chile, posiblemente por la importancia de la infección en la madre. Sin embargo, la muerte neonatal sigue siendo significativa. En un seguimiento de niños nacidos en la Maternidad de Tucumán, Argentina (1992-1995), se observaron 6 fallecimientos, entre ellos 4 niños con evidencia de infección por *T. cruzi* (un niño tratado con Nifurtimox), entre los 252 niños estudiados, entre los que se encontraron 32 con transmisión congénita. Este mismo estudio, iniciado en el Instituto Fatala Chabén de Buenos Aires en 1986, demuestra que cuando se aumenta la sensibilidad de detección, la incidencia de Chagas congénito aumenta. Hoy es importante el desarrollo y sobre todo, la prueba de campo a ciego, de métodos que aumenten la sensibilidad de detección de los casos congénitos, con la limitante de la

adecuación de los mismos a las condiciones sanitarias del área endémica para Chagas. Hemos investigado que el mayor número de estudios se realizará en las grandes ciudades y que el costo de la detección en este caso será alto, por lo que corre el peligro de eliminar la estrategia de detección en los Centros de Salud. Seguimos trabajando con datos estimados, que se harán realidad cuando en cada niño hijo de madre infectada por *T. cruzi*, se investigue la existencia de la infección por el parásito, redundando esto en la posibilidad de su tratamiento etiológico.

MR10: Diagnóstico y control de las infecciones por micobacterias

MR10. Lepra. ANTOLA M.

INP. "Dr. Mario Fatała Chaben" Dpto. de control de Lepra.

La endemia de lepra en la República Argentina tiene una distribución regional. Conforman el área las provincias de: Buenos Aires, Chaco, Córdoba, Corrientes, Entre Ríos, Formosa, Jujuy, Misiones, Salta, Santa Fe, Sgo. del Estero y Tucumán.

Las mayores prevalencias se registran en Chaco, Formosa y Misiones, con índices de 2-3/10000 hab.

Corrientes, Entre Ríos, Santa Fe, Sgo. del Estero y Tucumán registran tasas superiores a 1/10000 hab.; finalmente Bs.As., Córdoba Jujuy y Salta registran valores inferiores a 1/10000 hab.

La OMS ha definido la meta de control/eliminación de la lepra como problema de salud pública cuando las prevalencias nacionales alcanzan un nivel inferior a 1/10000 hab.

Si bien la tasa de prevalencia nacional de nuestro país ya es inferior (0.65/10000 hab.), este indicador es sensiblemente superior en algunas jurisdicciones del primer nivel subnacional (provincias). Las actividades de control están descentralizadas, asumiendo los programas provinciales la totalidad de la ejecución operativa.

El nivel central nacional recibe y analiza la información epidemiológica producida por los efectores, normatiza, supervisa, coordina y distribuye la medicación específica.

Todas las provincias del área endémica cuentan con servicios referenciales para diagnóstico y tratamiento, seis de ellas con laboratorios funcionando en red.

Buenos Aires, Misiones, Sgo. del Estero y Tucumán con redes en formación.

Corrientes y Entre Ríos aún no han implementado la integración con la red provincial.

MR11: Esquistosomiasis

MR11. Mecanismos de modulación del granuloma en esquistosomiasis. MIRKIN GA.

Depto. de Microbiología, Fac. de Medicina, Universidad de Buenos Aires. Buenos Aires, Argentina. gmirkin@fmed.uba.ar.

En modelos experimentales de esquistosomiasis por *Schistosoma mansoni* se ha demostrado que la inducción de la respuesta granulomagénica en la fase aguda está asociada a factores genéticos del huésped. Esto se refleja en: 1) La distinta capacidad de ratones con diferente

haplotipo del Complejo Mayor de Histocompatibilidad (CMH) para responder a los mismos epítopes de un antígeno (Ag), 2) Las diferencias en la respuesta a distintos Ag de extracto soluble de huevos de *Schistosoma* (SEA, (soluble egg antigens) y, 3) El perfil de citoquinas producidas tanto sistémica (bazo), como localmente (ganglios linfáticos mesentéricos inferiores, granuloma).

La modulación del granuloma durante la fase crónica, también es multifactorial. Si bien para su estudio se ha prestado mucha atención a la alteración del perfil de citoquinas producidas por linfocitos T en los ganglios mesentéricos durante la infección, son fenómenos que ocurren en el propio granuloma los determinantes del destino de esta estructura (crecimiento en volumen o modulación). Estos incluyen: 1) La producción de citoquinas no solamente por linfocitos T sino también por células accesorias, como eosinófilos y macrófagos, 2) La inducción masiva de apoptosis de linfocitos T CD4 en los granulomas pero no en los ganglios linfáticos, 3) La capacidad de células accesorias del granuloma para promover o proteger a los linfocitos T CD4 contra la apoptosis y, 4) La expresión de CD28 en los linfocitos T CD4. La expresión de ciertos haplotipos del CMH parece ser determinante en los tres últimos aspectos mencionados, lo que resalta la relevancia del perfil genético del huésped en el desarrollo de la patología. Las diferencias observadas en ratones con distinto haplotipo del CMH permiten definir modelos experimentales que presentan correlación positiva con algunos de los aspectos de las formas grave (hepatoesplénica) y moderada (intestinal o hepatointestinal) de la enfermedad humana.

MR11. Hospederos intermediarios de *Schistosoma mansoni*: Identificación molecular y susceptibilidad. SPATZ L, OSTROWSKI DE NUÑEZ M*, GRASSI L, GIL A*, GONZÁLEZ CAPPA SM.

Depto. de Microbiología, Parasitología e Inmunología, Fac. de Medicina, *Lab. de Helmintología, Fac. de Ciencias Exactas y Naturales, UBA. Linus@fmed.uba.ar.

La esquistosomiasis fue probablemente introducida en América hace menos de 400 años a través del tráfico de esclavos provenientes de África, algunos de los cuales estarían infectados tanto con *Schistosoma mansoni* como con *S. haematobium*. En América esta última especie no se pudo establecer dado que no encontró un hospedero adecuado que permitiera su desarrollo (no existen aquí caracoles del género *Bulinus* hospederos intermediarios de *S. haematobium* en África). En América existen veinte especies de caracoles del género *Biomphalaria*, (también presente en África y transmisor allí de *S. mansoni*), de los cuales solamente *B. glabrata*, *B. tenagophila* y *B. straminea* actúan como hospederos intermediarios naturales de *S. mansoni* desde el sur de Brasil hasta algunas islas del Caribe. Las otras especies no son transmisoras de *S. mansoni*, pero las causas de esta incompatibilidad hospedero-parásito aún no han sido bien establecidas. En términos generales se podría deber tanto a que el medio interno del caracol no es el adecuado para el desarrollo del parásito, como a la existencia de una fuerte resistencia natural del molusco que lo destruye a través de su sistema de defensa. Recientemente hemos realizado ensayos de dobles infecciones en el laboratorio (se infectan a los caracoles con miracidios de otro trematode, *Z. lunata*, y 24 horas después se los vuelve a infectar con miracidios de *S. mansoni*) utilizando *B. oligoza* y *B. orbigny*, especies consideradas no transmisoras. Al cabo de 6 semanas se ob-

servó que aproximadamente un 30 % de los caracoles expuestos a los dos trematodos emitían cercarias de *S. mansoni*, mientras que en aquellos expuestos solamente a *S. mansoni* (grupo control) no se observó emisión de cercarias. Estos resultados sugieren que *Z. lunata* estaría interfiriendo en la respuesta de defensa de los caracoles a *S. mansoni*, y que por lo tanto la incompatibilidad hospedero-parásito se debería a la resistencia natural de los caracoles y no las condiciones inadecuadas para su desarrollo.

La gran variabilidad que presentan las biomphalarias a nivel morfológico, incluso entre distintas poblaciones de una misma especie, trajo grandes problemas para la determinación de los ejemplares, por lo cual en los últimos años se utilizaron técnicas de biología molecular (PCR y RFLP), para caracterizar a prácticamente todas las especies del género presentes en América. Recientemente se ha secuenciado también la región ITS ribosomal de varias especies y se han estimado relaciones filogenéticas entre ellas. Tanto las características morfológicas como los estudios moleculares, han llevado a distintos autores a agrupar a varios integrantes del género en complejos de especies dado que son extremadamente similares entre sí. La compatibilidad con *S. mansoni* parece haber sido un evento evolutivo independiente en cada complejo, dado que las tres especies transmisoras en América pertenecen a distintos complejos y los árboles filogenéticos construidos las presentan en grupos claramente distintos.

MR11. Ferredoxina NADP+ reductasa, una nueva enzima detoxificante de *Schistosoma mansoni*. SERRA E, GIRARDINI J.

Instituto de Biología Molecular y Celular de Rosario IBR-CONICET. Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas. UNR. Rosario. Argentina. eserra@arnet.com.ar

En los últimos años, diferentes enzimas antioxidantes han sido clonadas y bien caracterizadas en *Schistosoma mansoni*: dos formas de Cu-Zn superóxido dismutasa (SOD), glutatión peroxidasa (GPX), citocromo c peroxidasa y cinco isoformas de glutatión S-transferasas, las cuales participan en la defensa del daño oxidativo producido por la acción de componentes del sistema inmune y de drogas antiparasitarias. Una actividad de glutatión reductasa (GR) ha sido parcialmente caracterizada en extractos crudos preparados a partir de diferentes estadios del parásito. Ninguna actividad catalasa ha sido detectada en *S. mansoni*.

En helmintos en general, ninguna actividad relacionada con el sistema microsomal dependiente del citocromo P-450 (el mecanismo de detoxificación de xenobióticos tipo I más importante) ha sido encontrada. Esta ausencia se ve compensada con una alta expresión de enzimas de detoxificación de tipo II, como las glutatión S-transferasas, una de las cuales (Sm28GST) puede representar hasta el 5 % de la proteína soluble total en parásitos adultos Sm28GST es también un antígeno mayor de *S. mansoni*, anticuerpos bloqueantes de su actividad afectan el desarrollo del parásito y la deposición de huevos por parte de las hembras (factor principal en el desarrollo de la patología) y es utilizado en vacunas experimentales.

La existencia de una GPX como única enzima capaz de detoxificar los radicales peróxido, por un lado y el sobredimensionamiento de las actividades de GSTs por el otro, sugieren que la enzima GR, única fuente celular de glutatión reducido, juega un rol central en los mecanismos de defensa al estrés químico en esquistosomas. Esta presunción se ve avalada por la observación que el oltipraz,

una droga con actividad esquistomicida y anticancerígena, tiene un importante efecto inhibitorio sobre la actividad de esta enzima *in vitro* y que parásitos tratados con oltipraz son sensibles al ataque oxidativo de macrófagos peritoneales de ratón.

Una actividad oxidorreductasa, capaz de reaccionar con lípidos hidroxiperoxidados, dependiente de NADPH y de localización mitocondrial ha sido caracterizada parcialmente en *S. mansoni*, siendo la única enzima de detoxificación de tipo I encontrada hasta el momento en este parásito. La localización subcelular, así como la dependencia de NADPH hacen pensar que se trate de una enzima de la familia de las ferredoxina NADP+ reductasas (FNRs). Recientemente FNRs de diferentes orígenes han sido implicadas en la defensa contra radicales reactivos de oxígeno, mediante un mecanismo todavía no dilucidado, lo cual apoya esta presunción.

En nuestro laboratorio obtuvimos un clon de longitud completa que codifica para una enzima homóloga a las FNRs de origen mitocondrial. La enzima fue producida en *E. Coli* mediante diferentes sistemas de expresión y fue utilizada para preparar anticuerpos y realizar estudios funcionales. Los estudios de RT-PCR muestran que la FNR se expresa en todos los estadios del ciclo de vida del parásito pero en cantidades diferentes. La FNR de *S. mansoni* fue asociada a una única actividad diaforasa existente en extractos totales de *S. mansoni*.

En paralelo hemos obtenido un clon de longitud completa que codifica para una proteína homóloga a las dehidroascorbato reductasa dependiente de glutatión (GDHAR) de distintos orígenes. Esta enzima cataliza la reducción de dehidroascorbato regenerando ácido ascórbico, el cual es un antioxidante capaz de reaccionar con radicales peróxido. Esta enzima representaría una nueva actividad de defensa al estrés oxidante, dependiente de ascorbato, sin embargo no se ha determinado si *S. mansoni* es capaz de sintetizar ácido ascórbico *de novo* o si recupera este compuesto del huésped. Esta nueva enzima, podría estar supliendo la deficiencia de catalasas en distintos tejidos del parásito.

MR12: Bioquímica y biología molecular de protozoarios parásitos III

MR12. Transportadores ABC en protozoos parásitos. GAMARRO F, PÉREZ-VICTORIA JM, TORRES C, PARODI A, PÉREZ-VICTORIA FJ, CORTÉS F, ARAUJO JM, CASTANYS S.

Instituto de Parasitología y Biomedicina «López-Neyra». Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Granada, España. gamarro@ipb.csic.es

La resistencia a fármacos constituye uno de los problemas que obstaculizan el éxito del tratamiento terapéutico en la lucha contra el cáncer, enfermedades producidas por protozoos parásitos o infecciones producidas por hongos patógenos. En muchos casos, las células evaden los efectos citotóxicos mediante la eliminación de las sustancias citotóxicas a través de unas proteínas sobreexpresadas, principalmente en la membrana plasmática, pertenecientes a la superfamilia de transportadores ABC (ATP-Binding Casette). Algunos miembros de esta familia de transportadores como la glicoproteína-P (Pgp) o la proteína conocida como MRP (de multidrug resistance-associated protein) son

responsables de un fenotipo de multiresistencia a fármacos, también conocido como fenotipo MDR (de multidrug resistance). Estas proteínas presentan una amplia distribución a lo largo de toda la escala biológica desde organismos procariontes hasta mamíferos, habiéndose descrito actualmente más de 1.100 proteínas diferentes. Los transportadores ABC son grandes polipéptidos (entre 140-190 kDa), que presentan como característica estructural el poseer dos mitades homólogas, cada una de ellas conteniendo un dominio de unión a nucleótidos (NBD), responsable de la hidrólisis de ATP necesario para la funcionalidad de la proteína, y un dominio de transmembrana (TM) involucrado en la unión de sustratos. Nosotros estamos interesados en la caracterización molecular y funcional de genes ABC, específicamente genes de la familia Pgp-MDR y MRP. Hemos contribuido a la caracterización molecular y funcional de nuevos transportadores ABC en los protozoos parásitos *Leishmania* y *Trypanosoma cruzi*. Actualmente, en *Leishmania* se conoce la presencia de 1 transportador Pgp-MDR y 5 transportadores del tipo MRP. En *T. cruzi* hemos descrito 2 transportadores del tipo MRP y, por el momento, no hemos encontrado ningún transportador Pgp-MDR. Se ha descrito un gran número de moduladores o quimiosensibilizadores de estos transportadores en organismos eucariotas que, sin embargo, no son eficaces debido a su alta citotoxicidad e inespecificidad. En la búsqueda racional de nuevas sustancias quimiosensibilizadoras del fenotipo MDR, hemos diseñado una estrategia combinatorial para revertir la resistencia a fármacos empleando compuestos que se unen a los dominios NBDs y TMs y que de una manera muy eficaz modulan el fenotipo MDR en *Leishmania*, pudiendo ser extrapolada a otros organismos eucariotas. La estrategia incluye el empleo de compuestos naturales como flavonoides y sesquiterpenos, usando por un lado: i) estudios *in vitro* de selección de compuestos que se unan con alta afinidad al dominio recombinante NBD C-terminal de *Leishmania*, ii) ensayos de los compuestos seleccionados sobre la acumulación de fármacos en parásitos y iii) estudio del efecto revertidor *in vivo* de los anteriores compuestos sobre la resistencia a fármacos, empleando para ello una línea de *Leishmania tropica* con un fenotipo MDR que sobreexpresa la Pgp. Más recientemente, nuestro grupo de investigación, está involucrado en la caracterización molecular y funcional en protozoos parásitos de una nueva familia de transportadores conocida como ABCA. En células de mamíferos estas proteínas están implicadas en el transporte de lípidos (fosfatidilserina) a la membrana plasmática en un proceso que está regulado por los niveles de esteroides. La exposición de fosfatidilserina en la superficie de células apoptóticas dispara el proceso de fagocitosis por parte de los macrófagos. Se cree que los transportadores ABCA podrían funcionar como flipasas de membrana que translocarían lípidos desde una monocapa de la bicapa lipídica a otra. Esta translocación podría originar un cambio en la reorganización de la composición lipídica de la membrana plasmática y la redistribución de ciertas proteínas de superficie. La posible implicación de estos genes en el proceso de invasión celular y patogénesis, nos ha llevado a considerar como muy importante su estudio funcional.

MR12. Estructura del octámero nucleosomal en la cromatina de *Trypanosoma cruzi*. GALANTI N⁽¹⁾, PAULINO M⁽²⁾, TORO GC⁽¹⁾ y TAPIA O⁽³⁾.

⁽¹⁾Programa de Biología Celular y Molecular, ICBM, Facultad de Medicina, U. de Chile; ⁽²⁾DEQUIFIM, Facultad

de Química, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay; ⁽³⁾ Physicochemistry Institute, Uppsala University, Uppsala, Sweden.

El *Trypanosoma cruzi* no forma cromosomas durante la división celular. Además, su cromatina es más sensible a nucleasa micrococcal y a fuerzas iónicas crecientes de soluciones salinas, que la cromatina de eucariotes más recientes.

El nucleosoma, unidad básica de la estructura de la cromatina, está constituido por un octámero de cuatro histonas (H2A, H2B, H3 y H4) y un segmento de 146 pb de DNA, que se enrolla alrededor del octámero. Una quinta histona (H1) se encuentra en la entrada y salida del DNA. Las histonas son proteínas de bajo peso molecular, básicas y muy conservadas. Sin embargo, se han encontrado diferencias importantes en la secuencia de aminoácidos de las histonas del octámero en *T. cruzi*. Mas aún, la histona H1 de este parásito corresponde solo al dominio carboxilo de las histonas H1 de eucariotes recientes. Con esta información de secuencia aminoácídica, hemos proyectado las estructuras secundaria y terciaria de las cuatro histonas del octámero nucleosomal de *T. cruzi*. Además, teniendo en consideración la estructura cristalina de la partícula nucleosomal humana a 2.8 Å de resolución, hemos modelado el octámero del nucleosoma de *T. cruzi*.

Nuestros resultados indican que las estructuras secundaria y terciaria de las histonas (histone fold) está conservada en *T. cruzi*, a pesar de las importantes diferencias en las secuencias aminoácídicas entre este parásito y eucariotes recientes. El ensamblaje tripartito del nucleosoma observado en mamíferos (dos heterodímeros H2A y H2B y un tetrámero H3 - H4), también está conservado en *T. cruzi*. Sin embargo, en este parásito existen importantes diferencias en las interacciones entre las tres partes del octámero, que explicarían la alta sensibilidad de la cromatina de *T. cruzi* a nucleasa micrococcal y altas fuerzas iónicas. Esta menor estabilidad del octámero, así como la presencia de una histona H1 más corta, puede también explicar, al menos en parte, la ausencia de condensación de la cromatina en cromosomas durante la mitosis en este parásito.

Financiado por SIDA-SAREC y D.I.D. (Proyecto Enlace)

MR12. Poliaminas en parásitos tripanosomátidos. CARRILLO C, CEJAS S, CORTES MM, HUBER A, BRAVO M, GONZÁLEZ NS, ALGRANATI ID.

Instituto de Investigaciones Bioquímicas Fundación Campomar, FCEyN (UBA) Buenos Aires, Argentina. algra@iib.uba.ar.

Con el propósito de investigar el posible rol de las poliaminas en el control de la proliferación de parásitos hemos estudiado la regulación del metabolismo y el transporte de dichas sustancias en varios tripanosomátidos como *Leishmania mexicana*, *Crithidia fasciculata*, *Phytomonas* y *Trypanosoma cruzi*.

Todos los protozoarios estudiados, con la excepción de los epimastigotes de *Trypanosoma cruzi*, mostraron una activa biosíntesis de putrescina a partir de ornitina, mediante la reacción catalizada por la enzima ornitina descarboxilasa (ODC), cuya existencia se demostró tanto en estudios *in vivo*, como en extractos celulares.

El bloqueo de la síntesis de putrescina por la droga difluorometilornitina (DFMO), inhibidor específico e irreversible de ODC, provoca la drástica reducción de las concentraciones intracelulares de poliaminas, y como consecuencia la detención de la proliferación celular de algunos

tripanosomátidos cuando se cultivan en medios semisintéticos libres de poliaminas.

El transporte de putrescina en la mayoría de los parásitos estudiados es inducible por ayuno de poliaminas, mientras en *T. cruzi* es constitutivo, lo que le permite captar estas sustancias del medio externo, compensando su incapacidad de sintetizarlas.

Por esta razón las cepas salvajes de *T. cruzi* no pueden proliferar en medios semisintéticos.

Cuando *Leishmania mexicana* se cultiva en un medio sin poliaminas, el agregado de DFMO disminuye la velocidad de crecimiento del parásito hasta detener su multiplicación después de varios pasajes en presencia de altas concentraciones de la droga. La proliferación puede reiniciarse rápidamente añadiendo putrescina o espermidina exógenas. También hemos observado que cultivos de *Leishmania* cuyo crecimiento se había inhibido por DFMO podían reiniciar su multiplicación espontáneamente después de un período variable de tiempo, aún en presencia de altos niveles de la droga. Se pudo demostrar que esta selección en una etapa de fenotipos de *Leishmania* resistentes a DFMO se debía a una superproducción de ODC provocada por una gran amplificación del número de copias del gen respectivo.

Recientemente hemos demostrado que la falta de la actividad enzimática ODC en *Trypanosoma cruzi* se debe a la ausencia del gen correspondiente en el genoma del parásito. Por esta razón hemos transfectado *T. cruzi* con un plásmido recombinante que contenía la región codificante completa del gen de ODC de *Crithidia fasciculata* que fue insertada en el vector de expresión pRIBOTEX, que es específico para tripanosomátidos.

Los parásitos transgénicos obtenidos demostraron poseer una alta actividad enzimática de ODC tanto en condiciones de transformación transiente como estable. Concomitantemente dejaron de ser auxótrofos para poliaminas, pudieron proliferar en medios sintéticos y se volvieron sensibles al DFMO.

Los estudios de estabilidad metabólica de ODC en distintos tripanosomátidos nos permitió establecer una correlación entre este parámetro y la sensibilidad o tolerancia a la droga DFMO.

MR12. Quinasas de proteínas relacionadas a la Cdc-2p, TzCRK1 y TzCRK3, y ciclinas relacionadas en *Trypanosoma cruzi*. TELLEZ- IÑON, M.T.

Instituto de Ingeniería Genética y Biología Molecular, INGEBI- CONICET y Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, UBA. Buenos Aires, Argentina. mtellez@dna.uba.ar.

Las quinasas dependientes de ciclinas, CDKs son proteínas que controlan el ciclo celular en células de eucariotas. En levaduras la transición entre las fases G1/S y G2/M esta regulada por la actividad de una única enzima codificada por el gen *cdc2* en *Schizosaccharomyces pombe* y por el gen *CDC28* en *Saccharomyces cerevisiae*. En eucariotas superiores, la regulación del ciclo celular está bajo el control de varias CDKs (CDK1-9). La actividad de estas quinasas está controlada por asociación con ciclinas, inhibidores y por eventos de fosforilación/defosforilación. En tripanosomátidos se han descrito varias quinasas de proteínas relacionadas denominadas CRKs, pero su función en el control del ciclo celular o en otros caminos metabólicos aún no se conoce. En nuestro laboratorio se han clonado y caracterizado parcialmente en *T. cruzi* dos quinasas del tipo CDKs denominadas TzCRK1 y TzCRK3. TzCRK1 codifica para

una proteína de 33 kDa con >78 % de identidad con *T. brucei* CRK1, *Leishmania mexicana* CRK1 y *T. congolense* CRK1.

La proteína recombinante GST-TzCRK1 es capaz de fosforilar histona H1 y la proteína del retinoblastoma (Rb). En ensayos de Western blot, IgGs purificadas del suero anti-GST-TzCRK1 reconocieron a una proteína de 33 kDa en las tres formas del parásito: ama, epi y tripomastigote. TzCRK1 se encuentra en igual cantidad en las tres formas, y se expresa en forma constitutiva, sin variar sus niveles a lo largo del ciclo celular en epimastigotes. Este anticuerpo inmunoprecipita, en extractos de epimastigotes, una actividad de quinasa, y los IPs son capaces de fosforilar histona H1 y la proteína Rb. La actividad enzimática no es inhibida por los inhibidores de CDKs.

Si los extractos se precipitan con p13Suc1-agarosa la actividad de quinasa de histona H1 de los IPs es inhibida por los inhibidores de CDKs, flavopiridol, roscovitina y olomoucine.

Por inmunomicroscopía electrónica en amastigotes la TzCRK1 se localiza en el citoplasma, regiones definidas del núcleo y está muy concentrada en el kinetoplasto, sugiriendo una función en dicha organela. El antisuero anti-PSTAIRES, empleado para identificar proteínas de la familia de la Cdc2p en otros organismos, reveló tres bandas de 32, 33 y 35 kDa en las tres formas del parásito. Este antisuero reconoce la proteína recombinante GST-TzCRK1, que tiene la serina del consenso PSTAIRES sustituida por una cisteína.

En ensayos de complementación empleando una cepa de *S. cerevisiae* mutante termosensible para la CDC28, las CRKs de *T. cruzi* no son capaces de revertir la mutación.

Para identificar proteínas que se asocien a estas quinasas se empleó el sistema de doble híbrido. El gen *tzcrk1* se subclonó en el vector pBTM116 fusionado con el dominio de unión a DNA del gen *lexA*. Esta construcción se usó para rastrear una biblioteca de cDNA de epimastigotes realizada en el vector de expresión de levaduras pVP16, en fusión con el dominio de activación del gen VP16. Se identificaron cerca de 20 clones distintos *his⁺/lacZ⁺*, que se secuenciaron y analizaron. Tres de ellos presentaron identidad con la proteína PREG de *Neurospora crassa* y PHO80 *Saccharomyces cerevisiae* (*Sc*), que pertenecen a la familia de ciclinas. En *T. cruzi* se denominaron TzCYC4, 5 y 6. La PHO85, CDK de *Sc*, se une a diferentes ciclinas, y puede estar involucrada en la regulación del pasaje de G1/S y en la fosforilación de factores de transcripción que controlan la expresión de enzimas del metabolismo del fosfato. Estos resultados sugieren que TzCRK1 puede estar relacionada con el ciclo celular y/o otros procesos como el metabolismo del fosfato.

Para analizar la capacidad de TzCYC6 para revertir mutantes condicionales de ciclinas de G1 en *Sc*, se realizaron ensayos de complementación. La expresión de la proteína del parásito complementó el fenotipo mutante de las levaduras.

En un ensayo *in vitro*, dos de estas ciclinas también unen TzCRK3 indicando que estas quinasas pertenecen a la familia de las quinasas que dependen de ciclinas.

Financiado por WHO, UBA, FONCYT y CONICET.

MR13: Inmunosupresión y parasitosis

MR13. Enteroparásitos en pacientes HIV positivos. VELÁSQUEZ JN.

Hospital Municipal de Infecciosas «Dr. Francisco J. Muñoz», Hospital «Dr. José María Penna», ANLIS «Dr. Carlos G. Malbrán». Buenos Aires, Argentina. jorsil@overnet.com.ar

El Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida se manifiesta con preponderancia en el aparato digestivo, siendo la diarrea y la disfagia las manifestaciones más comunes. En los pacientes con SIDA un importante número de protozoarios han sido considerados como patógenos oportunistas productores de severos cuadros diarreicos.

Las estrategias clásicas para el diagnóstico de protozoarios en pacientes con SIDA y diarrea crónica dependen de la detección de los parásitos en fluidos y biopsias duodenales por microscopía óptica o microscopía electrónica de transmisión.

Esta presentación comprendió el estudio de 118 pacientes adultos de ambos sexos, con edades que variaron entre los 21 a 41 años, con SIDA y diarrea con una duración igual o mayor de 1 mes, con CD4 < 500.

Los aspirados duodenales y las materias fecales se recolectaron y conservaron en solución salina formolada al 5% a temperatura ambiente. Las materias fecales se concentraron y se observaron en forma directa y en extendidos coloreados con las técnicas de Kinjoun y Tricromo azul. Los sedimentos de los aspirados se colorearon con las técnicas anteriores.

Se realizaron videoesofagogastroduodenoscopías (VEDA) con un equipo Pentax EPM 2000. En todos los pacientes se aspiró líquido duodenal y se obtuvieron cinco biopsias de la porción más distal del duodeno. Dos de las muestras se fijaron en formol 10% para efectuar estudios histológicos de rutina y las otras tres se conservaron con el fijador de Karnovsky. Las biopsias incluidas en parafina se colorearon con Hematoxilina-eosina y Giemsa. Las muestras fijadas con Karnovsky se cortaron en secciones de 2 µm de espesor y se colorearon con Azur II. En los casos sugestivos de Microsporidiosis se realizaron cortes ultrafinos de 70-150 nm que se colorearon con uranil acetato y se observaron en el microscopio electrónico de transmisión (TEM).

Con la metodología utilizada se llegó al diagnóstico en 45 casos del total de 118 pacientes. Las tres primeras causas de diarrea crónica en estos pacientes fueron: *Cryptosporidium* sp (13/45), Microsporidiosis (11/45) e *Isospora* sp (8/45).

Con estos métodos se detectaron 8 pacientes en los que se diagnosticó *Isospora* sp. En dos pacientes se pudo identificar algún estadio del ciclo evolutivo del parásito en lámina propia. El examen histológico permitió identificar formas que, dependiendo de la incidencia del corte, eran ovales o redondas con una estructura que las recubría. El conocimiento de ellas es imprescindible pues el hallazgo de cualquiera de ellas es diagnóstico de isosporosis. Los zoocitos estaban presentes en lámina propia en dos casos, con resultados negativos en el examen de materia fecal. Ellos estaban localizados en una vacuola parasitófora. Basados en la morfología en cortes histológicos y por microscopía electrónica, no fue posible diferenciar estas estructuras al nivel de especie.

Se desarrolló una técnica de PCR para estudiar en materias fecales, aspirados duodenales y biopsias duodenales la presencia de *Enterocytozoon bienewisi*. Se diseñó un par de primers que amplifica la secuencia del espaciador intergénico de los genes del ARN ribosomal del parásito. También se desarrolló la técnica de hibridación *in situ* sobre cortes histológicos de biopsias duodenales de dos pacientes con SIDA, diarrea crónica y diagnóstico de *E. bienewisi* confirmado por microscopía electrónica.

Se desarrolló un método sencillo de recolección y transporte de muestras de materia fecal para la detección de

Enterocytozoon bienewisi utilizando la técnica de PCR en papeles de filtro impregnados con materia fecal.

MR13. *Leishmania*/HIV co-infection: epidemiological features and diagnosis. CAMPINO L.

Unidade de Leishmanioses e Centro de malária e Outras Doenças Tropicais. Instituto de Higiene e Medicina Tropical. Universidade Nova de Lisboa. Portugal. campino@ihmt.unl.pt

In Portugal, as in other Mediterranean countries, visceral leishmaniasis is hipoendemic (an incidence of two cases per 1 million inhabitants) and zoonotic, with the dog as principal reservoir. The infection is caused by *Leishmania infantum* and transmitted in rural and peri-urban environments by phlebotomine sandflies. Three focus, in the northern, central and southern regions of the country are identified. The number of leishmanioses notified cases are underestimated. From 1970 to 1986, 93.2% of the infected individuals were children up to 15 years of age, while in the last decade this age group comprised 75.8% of the total number of cases. This decrease overlaps with the increase of *Leishmania* transmission in adults infected with human immunodeficiency virus. This emerging co-infection has changed the epidemiological and diagnosis features of Mediterranean leishmaniasis. The first case of co-infection was described, in Portugal, in 1986. Until May 2000, Leishmaniasis Unit has diagnosed 87 cases of leishmaniasis in HIV infected individuals. The majority of these patients lived in the central region of the country and the biological samples were sent to us by several Lisboa hospitals. The mean age of co-infected patients ranged from 24 to 41 years, about 80% of who were male, being the intravenous drug addicts the most affected risk group. Most cases fulfilled criteria for AIDS before diagnosis of leishmaniasis, being tuberculosis the concomitant opportunistic infection more frequent. The CD4+ lymphocyte count in 80% of patients was lower than 200 cells/ml. Although clinical manifestations in HIV-positive patients did not differ notably from those of immunocompetent individuals, over 20% exhibited cutaneous lesions and about 50% revealed parasites in atypical locations (broncho-alveolar lavage, peripheral blood, pleural fluid, rectum and skin). From our study both sexual and mechanical transmission may be involved. The classical serological techniques (IFI, CIE, and ELISA) presented low sensitivity in opposition to PCR and immunoblotting which still require further evaluation for application in routine diagnosis.

MR13. Enfermedad de Chagas e infección con HIV. FREILIJ H.

Laboratorio de Parasitología y Chagas. Hospital de Niños "R. Gutiérrez". Buenos Aires. freilij@sinectis.com.ar

Durante las últimas décadas el empleo de inmunosupresores en diversas situaciones médicas (transplante de órganos, enfermedades oncológicas) y la infección con HIV ha generado nuevos cuadros clínicos de alta morbimortalidad producidos por reactivación de infecciones crónicas o bien, infecciones agudas adquiridas a partir del vector o por transfusión. Las manifestaciones clínicas más graves y más frecuentes en pacientes coinfectados con el *T. cruzi* y HIV están producidas por el compromiso del SNC. Los hallazgos anatomopatológicos de la meningoencefalitis de pacientes con Chagas y HIV son similares a las descritas en pacientes chagásicos con leucemias, linfomas, transplantados de riñón. El cerebro muestra aumento del peso y volumen, áreas

hemorrágicas y necróticas poco delimitadas, pueden alcanzar varios centímetros y compromete la sustancia blanca y gris. Están localizadas preferentemente en los lóbulos cerebrales, aun no se han descrito en los núcleos de la base. La microscopía muestra lesiones de meningoencefalitis con focos de necrosis y hemorragias, nódulos de microglia, edema. En el espacio perivascular se hallan exudados con presencia de macrófagos, linfocitos y plasmocitos. Los amastigotes se encuentran dentro de las células gliales y macrófagos o libres alrededor de los nódulos microgliales.

El corazón es otro órgano que muestra alteraciones, muchas veces severas. Los patrones histológicos son similares a los hallazgos de la miocarditis aguda y crónica: edema, infiltrado mononuclear, presencia de amastigotes dentro de los miocitos o en forma libre. También se describen lesiones en el resto de los órganos con presencia del parásito.

Las manifestaciones clínicas más frecuentes en estos pacientes están dadas por el compromiso del SNC y en segundo lugar por las lesiones cardíacas. En 1994 Rocha et al realiza la primera revisión, con 23 pacientes de Brasil, Chile y Argentina con HIV y Chagas; 87% presentaba severas lesiones multifocales del SNC, meningoencefalitis difusa con necrosis y hemorragias. En 16 pacientes se realizó TAC de cerebro, 15 mostraban lesiones pseudotumorales: 4 tenían múltiples imágenes, 4 con 2 lesiones y los 8 restantes lesión única. El LCR de 9 pacientes tenía pleocitosis con linfocitosis, presencia de neutrófilos y eosinófilos, 8 tenía aumento de proteínas. Todos los corazones estudiados presentaban signos de miocarditis: 4 con lesiones agudas, 2 con lesiones crónicas y 1 con lesiones agudas y crónicas. Diagnóstico serológico: 15/17 reactiva en suero; 2/5 en LCR. El parásito fue hallado en 8/12 muestras de suero y en 9/10 en LCR. Muchos otros trabajos presentan datos similares a este. Pagano et al comunica que 2/10 de los pacientes adquirieron el *T. cruzi* por transfusión. Para otros autores el diagnóstico de la parasitosis fue realizado por la biopsia cerebral.

Son menos frecuentes los cuadros clínicos atribuidos a lesión miocárdica. Al respecto en sendos trabajos Sartori y Labarca muestran cuadros de miocarditis aguda, severas arritmias, shock cardiogénico, etc. La mayor parte de los pacientes con síntomas clínicos tenían CD4 inferiores a 100. La respuesta al tratamiento con nifurtimox o benznidazol fue variada, los fracasos terapéuticos en muchos casos es atribuible a la tardanza del diagnóstico. Lamentablemente todavía el diagnóstico de Chagas no está incorporado en el pensamiento de muchos infectólogos. Dado que la mayor parte de estos pacientes inician con síntomas neurológicos reciben primero tratamiento para toxoplasmosis y ante su fracaso intentan nuevos caminos, pero suele ser tarde.

Conclusiones: debe estudiarse la infección por *T. cruzi* en todo individuo con HIV, si fuera negativo en su inicio, debe repetirse si recibe transfusiones o permanece en áreas endémicas. Realizar tratamiento etiológico. Estudiar por métodos parasitológicos directos (Xenodiagnóstico o Microhematocrito) todo paciente con esta coinfección que presenta fiebre, síntomas neurológicos o cardíacos y CD4 bajos; su positividad permite un rápido inicio del tratamiento y mejor respuesta. Eventualmente establecer profilaxis terapéutica en estos pacientes que tengan CD4 menor a 200. Hemos observado niños que adquirieron ambos agentes durante el embarazo o en el período perinatal; la transmisión transplacentaria del *T. cruzi* es mayor si la embarazada tiene HIV, el diagnóstico se realizó por Microhematocrito al nacer, la serología era negativa

MR13. Enfermedad de Chagas en el huésped trasplantado. RiarTE A, LUNA C, SINAGRA A.

Inst. Nacional de Parasitología. Dr.M Fatała Chabén. Bs.As. Argentina.

La reactivación de la enfermedad de Chagas crónica (ECH) y la transmisión de la infección por *T. cruzi* por el implante son dos eventos clínicos posibles en la interrelación receptores / donantes seropositivos para ECH. En 1988, en nuestro país se liberalizó el criterio de aceptación de órganos y desde ese momento se distribuyeron órganos con serología reactiva para ECH. La experiencia desarrollada permitió conocer la evolución de esta enfermedad en diferentes tipos de trasplante (Tx). Estudios previos habían sugerido que la reactivación de la ECH no era un evento posible en su asociación con inmunosupresión de diferentes etiologías. Sin embargo, la mayor casuística desarrollada posteriormente permitió conocer la magnitud de este problema. La aplicación de un monitoreo sistemático estableció los criterios diagnósticos de ambas situaciones clínicas: reactivación e infección. La administración temprana del benznidazol en forma preventiva o terapéutica permitió la recuperación de todos los pacientes evitando la mortalidad relacionada, atribuida en las primeras descripciones a la etiología transfusional. El criterio de inclusión de los pacientes en ese protocolo fue la serología reactiva (2/3 técnicas +) para ECH. El protocolo se basa en la búsqueda de parásitos en sangre, LCR o en tejidos por medio de biopsias, y en la detección de Ac. por lo menos por 2 técnicas serológicas en los casos de transmisión. La frecuencia de los estudios es semanal los 3 primeros meses, quincenal el tercer mes y mensual en adelante durante todo el período de inmunosupresión. El diagnóstico de reactivación o infección se basó en la búsqueda de parásitos en sangre y LCR por métodos directos o en tejidos por biopsias del órgano comprometido. La población de pacientes con ECH en un centro de referencia de Tx renal fue de 17,22 %. La reactivación de la ECH en este tipo de Tx fue de 21.7% (5/23 P) y la transmisión por el implante de 18.7%. El período crítico de reactivación de la ECH fue desde los 30 días hasta los 6 meses sin embargo puede haber episodios más allá de estos tiempos con o sin relación con el incremento de mayor inmunosupresión por situaciones de rechazo o por evolución de su propia enfermedad basal.

La población de pacientes con ECH en dos centros referenciales de Tx hepático fue de 3.4%. Ocho pacientes receptores chagásicos recibieron un Tx hepático y durante todo el seguimiento (4 -40 meses) no se observó reactivación de la ECH crónica. La transmisión por el implante se observó tanto en Tx renal como hepático este último realizado en situación de emergencia clínica. El diagnóstico tanto en episodios de reactivación o infección fue en la mayoría de los casos por la detección de parasitemia por el método de Strout o por la presencia de paniculitis cutánea con la observación de amastigotas de *T. cruzi* en las biopsias correspondientes. No se observaron variaciones en los títulos de Ac. en los episodios de reactivación. En los casos de transmisión el diagnóstico se basó también en la conversión serológica, aunque hubo situaciones de detección de parasitemia en ausencia de conversión serológica.

El Tx de médula ósea constituye una experiencia particular. Por su situación de inmunosupresión severa el Tx alogénico es el de mayor riesgo de reactivación. El Tx de tipo autólogo (n=8) no presentó reactivación durante su evolución, sin embargo el de tipo alogénico la presentó en un 37.5% (3/8) de los receptores chagásicos, todos por parasitemia patente.

La experiencia adquirida permite recomendar que para el diagnóstico de reactivación o infección la búsqueda de parásitos en sangre, LCR o en lesiones orgánicas es siempre más relevante que la serología. Que la conversión serológica tiene valor diagnóstico en casos de transmisión por el implante pero una serología no reactiva no descarta una infección chagásica en curso. Que el benznidazol fue siempre útil para recuperar clínicamente los pacientes. Que el diagnóstico temprano de los episodios de reactivación o infección permite aplicar el tratamiento parasiticida en forma preventiva y por lo tanto en momentos de mayor eficacia terapéutica antes que el compromiso clínico sea severo por la continua replicación del parásito. Que se debe realizar siempre la profilaxis del dador vivo relacionado chagásico en los casos de receptor negativo para ECH. Que la aplicación del monitoreo sistemático fue siempre de fácil aplicación y seguro para el diagnóstico temprano. La transmisión de la infección chagásica por el implante es un hecho controvertido por la utilización de dadores chagásicos en recipientes seronegativos. La liberalización de los criterios de Tx permitió incorporar pacientes chagásicos en las listas de espera. La enfermedad de Chagas no debe ser actualmente considerada una contraindicación para el Tx.

MR14: Inmunomodulación en la infección por helmintos

MR14. Producción de citoquinas en la infección temprana con *E. granulosus* en ratones. DEMATTEIS S, NIE-TO A, ÖRN A, PIROTTI F, MARQUÉS J & BAZ A.

Cátedra de Inmunología. Facultad de Química. Facultad de Ciencias. Montevideo. Uruguay. abaz@bilbo.edu.uy

La infección por el helminto *E. granulosus* constituye un problema sanitario importante en muchas áreas endémicas. La interacción hospedero-*E. granulosus* se investiga generalmente utilizando la infección de ratones con protoscolecetes. No se sabe aún si en la infección con *E. granulosus* existe alguna correlación entre respuestas de citoquinas tipo 1 o 2 con resistencia o susceptibilidad. En este punto se centra la investigación realizada en este trabajo como objetivo general.

En primer lugar se demostró que *E. granulosus* induce un perfil de citoquinas tipo 2 en las primeras etapas de la infección en ratones Balb/c con una dosis de 2000 protoscolecetes. Seguidamente se evaluó cuáles podrían ser las células que participan en dicha respuesta de citoquinas utilizando ratones knock out en células CD4⁺ y/o CD8⁺ de background C57Bl/6. Los resultados mostraron que los ratones C57Bl/6 produjeron una respuesta temprana de citoquinas de tipo 0. Además sugieren que las células CD4⁺ estarían involucradas en la producción de todas las citoquinas detectadas, que las CD8⁺ solo participarían en la secreción de IL-5 y que células CD4⁺CD8⁻ podrían contribuir en la secreción de IL-10 e IFN γ . El segundo objetivo de este trabajo fue evaluar el papel de antígenos no proteicos en la inducción de la respuesta tipo 2 en ratones Balb/c. Se preparó una fracción antigénica de protoscolecetes enriquecida en carbohidratos (E4⁺) la cual solo indujo la secreción de IL-10 en ratones inoculados con E4⁺ o infectados. Interesantemente, E4⁺ indujo la secreción de IL-10 por células peritoneales de ratones infectados o vírgenes. Esto sugiere que antígenos no proteicos podrían favorecer la in-

ducción de citoquinas tipo 2 en las primeras etapas de la infección de ratones Balb/c. Finalmente, se analizó si la respuesta de citoquinas depende del nivel de exposición del hospedero al parásito. Para ello se inocularon ratones Balb/c con una dosis de 500 o 2000 protoscolecetes y se analizó la respuesta de citoquinas en la infección temprana y tardía. Los resultados mostraron que la inoculación de una baja dosis de parásitos indujo una respuesta de citoquinas temprana tipo 0 y una respuesta tardía tipo 2. Contrariamente, la inoculación de la dosis mayor indujo una respuesta temprana tipo 2 y una tardía tipo 0. Interesantemente, en el grupo inoculado con la menor dosis el desarrollo del parásito fue menor que en el grupo inoculado con la mayor dosis, aunque no es posible relacionar este resultado con la respuesta de citoquinas temprana de cada grupo experimental.

En conclusión nuestros resultados sugieren que: a- la respuesta de citoquinas en la infección experimental con *E. granulosus* depende del background genético del hospedador, de la dosis a la que se expone y del momento de la infección en que es analizada; b- las células CD4⁺ están principalmente involucradas en la respuesta de citoquinas aunque las células CD4⁺CD8⁻ podrían también participar en la secreción de IL-10 e IFN γ y c- antígenos no proteicos de protoscolecetes de *E. granulosus* podrían promover indirectamente una respuesta de citoquinas tipo 2 en ratones Balb/c a través de la inducción de IL-10.

Este trabajo fue financiado por: CSIC, SAREC, PEDECIBA, Unesco-Relacin, Conicyt-Clemente Estable (N° 2052 y 4002).

MR14. Inmunomodulación en triquinosis. NUÑEZ G G.

Departamento de Microbiología, Inmunología y Biotecnología. Cátedra de Inmunología, Instituto de Estudios de la Inmunidad Humoral (IDEHU-CONICET) Facultad de Farmacia y Bioquímica (UBA) Buenos Aires, Argentina. guillenu@ffybu.uba.ar

La triquinosis es una enfermedad parasitaria endémica en Argentina y en diversas regiones del mundo, caracterizada por fiebre, edema periorbital, mialgias y eosinofilia.

La infección se adquiere principalmente mediante la ingesta de carne de animales carnívoros cruda o mal cocida conteniendo quistes con larvas infectivas de nematodos del género *Trichinella*. En nuestro país el principal reservorio de esta parasitosis es el ganado porcino y el agente etiológico involucrado en brotes epidémicos es *T. spiralis*.

En triquinosis, como en muchas infecciones parasitarias, se alcanza un equilibrio entre el hospedador (H) y el parásito (P) de tal forma que ambos sean capaces de sobrevivir. Este equilibrio se encuentra determinado por una modulación entre los mecanismos efectores del sistema inmune (SI) tendientes a eliminar al P y los mecanismos de evasión parasitaria a la respuesta inmune del H.

T. spiralis, helminto histotrópico, es capaz de desencadenar respuestas inmunes del tipo Th2 donde los principales mecanismos de ataque al P tienen lugar a nivel intestinal mediante la expulsión de los vermes adultos, mediada por citoquinas (IL-3, IL-4, IL-5, IL-9), mastocitos y la secreción de mucus y a nivel sistémico mediante el mecanismo de citotoxicidad celular mediada por anticuerpos (CCDA) en donde monocitos, neutrófilos y eosinófilos junto con inmunoglobulinas específicas son capaces de destruir al estadio migrante o larva recién nacida (LRN).

Como mecanismos de evasión a la actividad del SI, el P es capaz de generar: a) un proceso de enquistamiento en músculos estriados en donde las larvas pueden permanecer protegidas del ataque por células efectoras, b) varia-

ciones antigénicas de la cutícula larvaria de tal forma que los anticuerpos sintetizados contra un estadio no resultan totalmente efectivos contra formas más evolucionadas del P, c) inducción de la síntesis de anticuerpos no citotóxicos los cuales son capaces de unirse a antígenos de la cutícula de la LRN pero resultan incapaces de interactuar con células efectoras para desencadenar la muerte de la misma. Por otra parte dichos anticuerpos no citotóxicos no solo son incapaces de inducir la muerte parasitaria sino que además poseen la propiedad de bloquear la acción de anticuerpos citotóxicos en el mecanismo de CCDA. d) el P es capaz de liberar al torrente sanguíneo antígenos solubles (productos de excreción-secreción, PES) los cuales bloquearían los sitios activos de los anticuerpos específicos impidiéndose así su interacción con el P. Dichos PES, glicoproteínas en su mayoría, son además capaces generar fenómenos de reactividad cruzada con antígenos de la cutícula de la LRN, siendo los responsables de la aparición de anticuerpos contra este estadio parasitario aún cuando éste ya no se encuentra presente en el H. Durante la infección se produciría un balance entre subpoblaciones de anticuerpos citotóxicos y no citotóxicos, siendo dicho balance a favor de estos últimos durante la fase crónica de la enfermedad. Nuestro grupo de trabajo postula que dicho fenómeno de reactividad cruzada entre estadios sería responsable de este mecanismo de modulación.

En síntesis, durante la infección por *T. spiralis* una compleja red de interacciones H-P tienen lugar en los distintos momentos del ciclo evolutivo del P, en donde los fenómenos de inmunomodulación, donde se incluyen los mecanismos de evasión parasitaria, deben ser tenidos en cuenta al momento de seleccionar antígenos blanco para el desarrollo de posibles vacunas tanto en el ganado porcino como en el ser humano.

MR14. Modulación de la respuesta Th1-Th2 por antígenos de *Fasciola hepatica* en ratas. CERVI L.

Parasitología, Dpto. Bioquímica, Fac. Cs. Químicas, Universidad Nacional de Córdoba, Córdoba, Argentina. lcervi@bioclin.fcq.unc.edu.ar.

Fasciola hepatica es un importante patógeno del ganado vacuno, ovino y caprino, responsable de significativas pérdidas económicas estimadas en 2000 millones de dólares anuales en todo el mundo. Este parásito también afecta la salud humana con una prevalencia en continuo incremento, que se calcula en 2,4 millones de personas infectadas. Drogas como triclabendazol es efectiva para el control de esta enfermedad, sin embargo el costo del tratamiento y algunas evidencias de resistencia del parásito a la droga, sugieren la necesidad del desarrollo de estrategias tales como la vacunación para el control de esta enfermedad. Durante la infección experimental en ratas con este parásito, nosotros encontramos un período de supresión transitorio de la respuesta proliferativa a Con A (día 7 p.i.) en las células de bazo de estos animales. Concomitantemente observamos un incremento en la producción de citoquinas IL-4 e IL-10 en el sobrenadante de células de bazo y una disminución en los niveles de IL-2. El bloqueo de IL-4 e IL-10 por el uso de anticuerpos neutralizantes, restituyó la proliferación celular, demostrando la participación de estas citoquinas en el fenómeno de supresión. Coincidentemente con el incremento de citoquinas tipo Th2 en el día 7 p.i., los hallazgos histológicos mostraron la presencia del parásito migrando a través de hígado con un infiltrado de polimorfonucleares, predominantemente eosinófilos. Por otra parte, los

macrófagos peritoneales de ratas infectadas obtenidos en el período supresor, mostraron una capacidad disminuida para producir óxido nítrico e incremento en la producción de IL-10. Sin embargo el bloqueo de esta citoquina con anticuerpo neutralizante no restituyó la capacidad de estas células para producir óxido nítrico. Una probable explicación de este fenómeno incluyen a otras citoquinas supresoras tales como TGF β o a moléculas liberadas por el parásito tales como glutatión transferasa, cuyo efecto supresor «in vitro» sobre la producción de óxido nítrico por células peritoneales normales, habíamos probado previamente. Conociendo el perfil de citoquinas inducido en la fase migratoria del parásito, resultó de interés estudiar la habilidad de diferentes antígenos de *F. hepatica* para modular la respuesta Th1-Th2 y generar posiblemente un mecanismo protector.

En esta primera etapa se evaluó la capacidad de un homogenato total (HT) del parásito para balancear las respuestas Th1-Th2 en los animales inmunizados. Los antígenos presentes en el HT del parásito resultaron inductores de un perfil Th1 en células de bazo estimuladas inespecíficamente con Con A, y específicamente en respuesta a antígenos del parásito, con incremento de IFN γ y disminución de citoquinas Th2 como IL-4 e IL-10. Por otra parte la inmunización de los animales con HT indujo un significativo incremento en la producción de óxido nítrico por las células peritoneales. El HT del parásito homogeneizado en AFC indujo significativos niveles de protección en los animales inmunizados con una reducción del 76% en el número de gusanos. El desbalance inducido por el HT en favor de una respuesta Th1 en el huésped, como así también el incremento en la producción de óxido nítrico por macrófagos peritoneales serían los factores que permitirían a los animales protegerse en contra de la infección. Por otra parte los oligodeoxinucleótidos que contienen secuencias no-metiladas con motivos CpG, han demostrado ser potentes adyuvantes de antígenos proteicos, incrementando anticuerpos específicos, secreción de IFN γ y respuestas T citolíticas. En nuestros ensayos in vitro los oligodeoxinucleótidos (ODN) con motivos CpG, generaron una respuesta Th1 en las células de bazo de animales normales, sugiriendo ser un adyuvante alternativo para mejorar en cantidad y calidad los niveles de protección obtenidos con el HT del parásito y eventualmente otros antígenos a ser probados.

MR14. Las proteasas parasitarias en inmunoprotección: el caso de *Fasciola hepática*. ACOSTA D.

Fasciola hepatica es un parásito trematode que infecta una gran variedad de especies rumiantes e incluso al hombre. En su ciclo de vida libre tiene una fase de multiplicación en huésped intermediario, generalmente caracoles del género *lymnaea*, y una posterior diseminación en las pasturas de formas infestantes. En el huésped definitivo los estadios juveniles migran desde el intestino y el peritoneo hasta el hígado donde alcanza la madurez sexual y comienza la deposición de huevos al medio ambiente.

Estudios in vitro han demostrado que los componentes mayoritarios de productos de excreción y secreción del parásito son enzimas proteolíticas del tipo cistein proteasas. Se postula que estas proteasas secretadas son mediadores moleculares importantes en los procesos de invasión al huésped, participando en la degradación de componentes de la matriz extracelular, y en la proteólisis de inmunoglobulinas del huésped.

Por otra parte, se han purificado enzimas proteolíticas a partir de extractos parasitarios, que fueron histoquímicamente

localizadas en el gastrodermis del parásito, por lo que se les asigna un rol en los procesos de adquisición de nutrientes.

El bloqueo de estas moléculas, biológicamente activas, es una estrategia racional en el control parásito. En este sentido, hemos optado por estudiar el valor inmunoprotector de estas enzimas en un huésped natural.

MR15: Nuevas herramientas en parasitología molecular

MR15. Aplicación de las nuevas tecnologías de manipulación genética de *T. cruzi* para el estudio de los mecanismos de expresión y recombinación genética. VAZQUEZ M, LORENZI H, BEN-DOV C, LEVIN M.

INGEBI, Buenos Aires, Argentina.
mvazquez@ingebi.dna.uba.ar.

El desarrollo de la tecnología de transfecciones para introducir ADN exógeno en kinetoplastidos durante los años 90 trajo aparejado un enorme progreso en el abordaje de la genética de estos protozoarios. La manipulación genética abrió nuevas puertas para el entendimiento y aprendizaje de mecanismos moleculares únicos o descubiertos por primera vez en kinetoplastidos y que luego sirvieron para enriquecer nuestro conocimiento de la biología molecular en general.

Aprovechando esta tecnología y con el objetivo de reforzar las herramientas moleculares que disponemos en la actualidad para la manipulación genética de *Trypanosoma cruzi*, en nuestro laboratorio hemos desarrollado y/o mejorado 3 tipos de vectores de ADN.

1) Vector de expresión de propósito general. El primero desarrollado fue pTEX (Kelly et al, NAR 15, 3963-3969, 1992) con gen marcador de resistencia a G418 (NEO), regiones de procesamiento del gen *gapdh*, sin promotor específico, que se mantiene como multímero episomal (extracromosómico). De allí, derivó pRIBOTEX (Martínez-Calvillo, GENE 199, 71-76, 1997), con promotor ribosomal, que mejoró disminuyendo el tiempo de selección y ofreciendo una recombinación espontánea al locus ribosomal (mayor estabilidad a lo largo de las generaciones). Sin embargo este vector utiliza una región de procesamiento crítica para trans-splicing. Trabajo desarrollado por nosotros ha demostrado que el nivel de expresión de un gen en *T. cruzi* es altamente sensible a la señal de trans-splicing que lleva adelante. Usando la señal HX1 caracterizada en nuestro laboratorio hemos aumentado en aproximadamente 2500 veces el nivel de expresión de dicho vector, medido con el reportador CAT y la proteína verde fluorescente GFP. La modificación del polilinker permite además un clonado más versátil y también hemos incluido tags que permiten dirigir proteínas al núcleo y al exterior celular. El vector se ha bautizado como pTRES.

2) Vectores de fragmentación cromosómica. Consisten en vectores de clonado circulares que al ser linealizados por una enzima de restricción dejan en un extremo la secuencia telomérica de un cromosoma de *T. cruzi* y en el otro un marcador de una región cromosómica que se quiere fragmentar, en el centro queda un gen de resistencia a drogas que permite seleccionar. Luego de transfección, se espera que ocurra recombinación homóloga por la región del marcador, de esta manera el cromosoma "se rompe" por esa región, pero se mantiene estable por la presencia del

telómero presente en el vector, el otro pedazo del cromosoma se pierde al carecer de telómeros en ambos extremos. La medida del acortamiento de este cromosoma fragmentado permite determinar la distancia de cualquier gen o marcador al telómero, técnica muy útil en el armado de mapas genéticos. Por otra parte, la técnica permite generar cepas haploides parciales o "knock-out" totales de genes o grupos de genes para estudiar sus funciones en la fisiología y estructura del organismo. Hemos empleado esta técnica con éxito en el estudio del locus TcP2b de *T. cruzi*.

3) Cromosomas Artificiales. Sin dudas, la forma menos traumática de modificar genéticamente este organismo es mediante la introducción un cromosoma artificial indistinguible de los endógenos, dado que no se modifica el background genético pre-existente con la influencia inesperada que muchas veces pueda tener sobre otros genes vecinos. La diferencia con el vector de fragmentación es que este retiene telómeros en ambos extremos luego de linealización. Como no conocemos que otras secuencias regulan la estabilidad y segregación de un cromosoma de *T. cruzi*, llámese centrómeros, orígenes de replicación, secuencias intracromosómicas, etc, debemos dejar que el parásito nos enseñe. Para ello introducimos la construcción mínima con telómeros y marcador de selección (NEO), así el parásito se verá obligado a retener este gen para subsistir incorporando al cromosoma artificial todas aquellas secuencias que le permitan mantenerlo. En nuestro caso, introduciendo el vector mínimo de 8 kb, hemos obtenido, luego de semanas de selección con droga, parásitos transgénicos que portaban cromosomas artificiales de 40, 50, 97 y 130 kb. El origen y función de las secuencias incorporadas está siendo estudiado en la actualidad.

MR15. Fagotopos para el estudio de determinantes antigénicos de proteínas de *Trypanosoma cruzi*. PITCOVSKY T, MUCCI J, ALVAREZ P, LEGUIZAMON MS* & CAMPETELLA O.

Laboratorio de Inmunología, Instituto de Investigaciones Biotecnológicas (IIB), Universidad Nacional de San Martín (UNSAM); *Dpto. de Microbiología, Fac. Medicina (UBA) Buenos Aires, Argentina. oscar@iib.unsam.edu.ar

La caracterización de epitopes relevantes permite su empleo en reemplazo del antígeno y constituye una alternativa para ensayos de diagnóstico, tipificación o inmunización. En el caso de antígenos proteicos, la identificación de epitopes puede realizarse desde varias aproximaciones incluyendo el análisis de fragmentos clonados en vectores de expresión. Sin embargo no siempre los epitopes de interés son secuenciales dificultando así su obtención en bacterias a partir de fragmentos génicos. Por otra parte es necesario tener clonado el gen o parte de él. Una alternativa accesible para identificar epitopes independizándose de la información disponible sobre estructura y conformación química del antígeno, lo constituyen las bibliotecas combinatorias de péptidos expresados en fagos.

Mediante el «screening» de fagos portadores de péptidos al azar con anticuerpos provenientes de infecciones o inmunizaciones, es posible identificar rápidamente aquellos que «mimetizan» al epitope genuino (mimotopes). Estos péptidos expresados en fagos (fagotopes) pueden seguidamente ser utilizados en inmunizaciones o eventualmente en diagnóstico. Hemos aplicado esta tecnología a la transilidada (TS) de *Trypanosoma cruzi* con el propósito de analizar su estructura antigénica.

Esta proteína está compuesta por dos regiones bien diferenciadas: una globular de aproximadamente 70kDa donde reside su actividad catalítica que es pobremente antigénica y una extensión C-terminal compuesta por una serie de repeticiones fuertemente antigénicas conocida como antígeno SAPA.

Utilizando sueros de conejos infectados, obtuvimos una colección de péptidos reactivos. Con esta información logramos identificar una serie de epitopes expuestos en la superficie de la molécula como surge de su distribución sobre un modelo 3D de la enzima. Los epitopes distribuidos en la región catalítica presentaron reacción cruzada entre ellos y con epitopes identificados en el antígeno SAPA. La presencia de epitopes capaces de dar reacción cruzada puede estar relacionada con la baja antigenicidad de la región catalítica de la enzima.

MR15 Vacunas vivas en medicina veterinaria. Uso de la cepa vacunal *Brucella abortus* s-19 como vector de antígenos parasitarios. COMERCI DJ, BUSI MV, RAMONDIN R, FRASCH ACC Y UGALDE RA.

Instituto de Investigaciones Biotecnológicas-Instituto Tecnológico de Chascomús (IIB-INTECH), Universidad Nacional de Gral. San Martín, CONICET, Buenos Aires, Argentina. dcomerci@iib.unsam.edu.ar

El género *Brucella* esta compuesto por bacterias patógenas intracelulares Gram-negativas que son el agente causal de la brucelosis, una zoonosis de distribución mundial que afecta a un amplio rango de mamíferos, desde delfines y animales domésticos hasta el humano. La brucelosis sigue siendo endémica en varios países en vías de desarrollo, causando serias pérdidas económicas. En animales domésticos como el ganado bovino, la característica principal de la patología es el aborto de las vacas primerizas y la esterilidad de los machos debido a la colonización de la placenta, tejidos fetales y órganos sexuales. Para controlar la infección, especialmente en países con grandes poblaciones ganaderas, la vacunación con la cepa atenuada *B. abortus* S-19 ha demostrado ser una estrategia apropiada. Esta cepa, atenuada naturalmente, confiere un alto nivel de protección, pero su éxito radica en el gran efecto antiabortivo que manifiesta. Sin embargo, una característica no deseada de la cepa radica en la similitud antigénica existente entre su LPS y los de las cepas patógenas de campo, lo que dificulta la discriminación inmunológica entre animales vacunados de infectados debido a la persistencia post-vacunación de los anticuerpos anti-LPS. La gran capacidad de esta bacteria para generar respuesta inmune celular y humoral la hace un candidato atractivo para su estudio como «carrier vivo» de antígenos heterólogos. En nuestro laboratorio exploramos como alternativa para solucionar estos problemas el etiquetado molecular de la cepa *B. abortus* S-19. Para tal fin, se desarrollaron una serie de vectores de expresión para *Brucella* (pBEV) que permiten el clonado en fase de antígenos heterólogos bajo promotores constitutivos o inducibles intracelularmente, con el agregado de secuencias correspondientes al péptido señal que permiten dirigir la expresión del antígeno recombinante al espacio periplásmico. Como «gen reporter» de estos constructos utilizamos la secuencia codificante del antígeno de fase aguda de *Trypanosoma cruzi*, SAPA. El antígeno consta de 14 repeticiones en tandem del motivo DSSAHSTPSTPA flanqueadas por extremos C y N terminales no repetitivos. Los análisis de western blot demostraron que rSAPA fue expresado en forma estable y traslocado al periplasma de *Brucella*. Inoculaciones ex-

perimentales usando el modelo murino demostraron que los anticuerpos generados contra el antígeno repetitivo de *T. cruzi* fueron detectables desde los 10 días p.i. incrementando el título hasta el final del periodo de muestreo (30 días). Siguiendo la característica de los antígenos proteicos presentados por *Brucella*, la respuesta humoral contra rSAPA fue predominantemente del tipo IgG2a. El vector de expresión pudo ser rescatado de las bacterias aisladas de bazo a los 15 días p.i., indicando que el plásmido fue mantenido en forma estable aún sin la presión de selección del antibiótico marcador. Para evaluar el uso de rSAPA como etiqueta molecular de la vacuna antibrucélica, se realizaron inoculaciones experimentales de la cepa recombinante en terneras. Los análisis de ELISA para detectar anticuerpos contra rSAPA y LPS bacteriano indicaron que todos los animales que recibieron la cepa vacunal recombinante desarrollaron respuesta humoral contra el antígeno heterólogo, detectable hasta los 4 meses post-vacunación. El uso de una vacuna viva portando una marca inmunológica distintiva como un tag antigénico, permitiría una rápida y sencilla identificación de los animales inmunizados, una herramienta de gran valor a la hora de implementar una campaña de erradicación de la brucelosis.

MR16: Aspectos actuales de la toxoplasmosis congénita

MR16. Toxoplasmosis congénita: aspectos epidemiológicos y de la transmisión. SPALDING SM.

LACEN Rio Grande do Sul, Brasil. spalding59@hotmail.com.

La toxoplasmosis es una antropozoonosis ampliamente distribuida en el mundo, y puede ser transmitida por ooquistes en las heces de los gatos, quistes tisulares o vía transplacentaria y llevar a la infección asintomática o a la enfermedad. La toxoplasmosis afecta cerca de 500 millones de personas en el mundo. En EUA la toxoplasmosis congénita afecta de 3,000 a 3 millones de niños por año. La exposición a la infección está directamente asociada a los hábitos culturales y a las condiciones de higiene. La toxoplasmosis congénita es una enfermedad frecuente que ocurre en la primo-infección durante el embarazo. La incidencia de toxoplasmosis congénita ocurre en 1/1,000 niños nacidos vivos. En el Brazil estudios serológicos en recién nacidos (Coutinho *et al.*) encontraron 8 niños recién nacidos con IgM anti-*Toxoplasma* y sin manifestaciones clínicas de la enfermedad. Castilho estimó en 11/1,000 recién nacidos la tasa de toxoplasmosis congénita inaparente y Kaniak encontró la incidencia de 17/1,000 de toxoplasmosis congénita, siendo que 3 presentaban sintomatología compatible con la enfermedad. Como no existe una vacuna efectiva, es importante la prevención, el diagnóstico precoz y el tratamiento pre-natal, neo-natal o post-natal. Para establecer medidas preventivas en una población es importante determinar cómo se infectan las personas. La profilaxia primaria es importante en mujeres embarazadas seronegativas y en los individuos inmunodeprimidos. Las mujeres deben ser orientadas a evitar el contacto con felinos, usar guantes para manipular la arena en los jardines, lavar las manos cuando manipulen las carnes crudas, tener cuidado con los alimentos, las legumbres y las frutas frescas. No deben ingerir carnes mal cocidas y leche no pasteurizada. La repetición de las pruebas en las embarazadas seronegativas

debe permitir un diagnóstico precoz y un manejo apropiado de las primo-infecciones - prevención secundaria. La infección de la placenta es un pre-requisito para la transmisión congénita. El diagnóstico de la toxoplasmosis congénita es de extrema importancia para los programas de atención a la gestante en países desarrollados y en vías de desarrollo, por los graves daños que puede provocar al feto. En una evaluación serológica realizada en 2.126 gestantes, atendidas en el Sistema Único de Salud de una región de la provincia del Rio Grande do Sul, Brazil, se verificó el comportamiento de los factores de exposición para la transmisión del *Toxoplasma*. Se observó que 74,5% presentaban anticuerpos específicos para *T. gondii*, de las cuales, 3,6% tenían IgM reactivo. El análisis de los factores de exposición a la infección por *T. gondii* - edad, contacto con el suelo, vivienda en zona rural, ausencia de servicio de recojo de basura/abastecimiento público de agua, contacto con gatos y con animales en general; con suínos, con ganado bovino, con perros, presencia de roedores, ingestión de carne cruda o mal cocida, de embutidos artesanales y de leche cruda, no pasteurizada - confirmó la asociación con la presencia de los anticuerpos (IgG) específicos. A través del modelo de regresión logística, se observó que todos los factores evaluados, con excepción de la edad, presentaron fracción de impacto etiológico mayor en la región urbana que en la rural. El contacto directo con gatos demostró tener mayor asociación con la infección en la zona urbana; el contacto de las gestantes con el suelo fue el factor que contribuyó de forma más intensa para la adquisición de la infección. Las gestantes de área rural presentaron mayor prevalencia de la infección con relación a las de área urbana. El impacto de los factores considerados de exposición, en un primer momento, podría ser mayor en el área urbana, pero había un incremento con el pasar del tiempo, así, a los 40 años, las dos áreas presentaban significativa diferencia (gestantes residentes en área rural con prevalencia ajustada 11 veces mayor). La tasa de transmisión congénita de la infección toxoplasmática fue de 6% en la población evaluada.

MR16. Diagnóstico de la toxoplasmosis congénita.
AMENDEIRA, MRR.

Dpto de Protozoología, Instituto Oswaldo Cruz - FioCruz, R. de Janeiro, Brasil. amendoei@gene.dbm.fiocruz.br

La toxoplasmosis congénita ocurre cuando la mujer es primoinfectada durante la gestación. La infección fetal podría ser atenuada o prevenida si hubiese detección precoz de las gestantes con riesgo (seronegativas) y un posterior seguimiento serológico de estas así como las que presenten serología de infección reciente a través de la terapéutica. En un seguimiento de 50 gestantes con infección aguda durante la gestación, en el Sur del Brasil, 3 (6%) tenían sus bebés infectados y solo uno (2%) con la enfermedad. En general, la búsqueda serológica de IgG y IgM se realiza por: IFI, ELISA y HAI. IgG es suficiente para establecer la infección. En IgM, que puede ser detectable por un año o más, un resultado positivo no indica la infección reciente. Para un diagnóstico de infección aguda, se hace necesario demostrar el aumento de anticuerpos en muestras seriadas de sueros. La seguridad en la detección de seroconversión en embarazadas es de gran importancia, porque la terapéutica inmediata evitaría cuadros graves para el feto. La avidez de IgG es un marcador importante para el diagnóstico de toxoplasmosis activa. Un resultado negativo de IgM rechaza la idea de infección recién adquirida en caso de que el sue-

ro no haya sido colectado en una fase tan inicial de la infección que la respuesta humoral aún no haya sido desarrollada. La detección de IgM es difícil de evaluar si no existe un aumento significativo en los títulos de IgG y IgM en muestras seriadas o en resultados de IgA (surge en paralelo con IgM y su permanencia es más limitada que esta) e IgE (poco estudiada) que sugieran una infección reciente. La detección de IgM e IgA es breve en caso de infección aguda en el adulto. El diagnóstico pre-natal es recomendado cuando la gestante adquirió la toxoplasmosis durante o antes del embarazo es muy sugestivo teniendo como referencia las pruebas serológicas. Por lo tanto, han sido utilizadas técnicas que evidencien el parásito como: inoculación en ratones o cultivo celular de sangre fetal obtenida por cordocentesis o de líquido amniótico, esto no es práctico para la rutina. El PCR muestra mayor sensibilidad y especificidad proporcionando un diagnóstico preciso de la infección fetal antes de las 20 semanas de gestación lo que es de vital importancia ya que el diagnóstico serológico no es recomendado por razones técnicas y porque los anticuerpos fetales solo son detectables luego de la maduración del sistema inmune. Otros hallazgos laboratoriales pueden sugerir infección fetal como: aumento de IgM total, eosinofilia, plaquetopenia, elevación de la concentración de gama-glutamyltransferasa y deshidrogenasa láctica. La ultrasonografía revela anomalías (dilatación de ventrículos cerebrales, engrosamiento de la placenta y hepatomegalia). La hidrocefalia y calcificaciones cerebrales son característicos pero no son patognomónicos. La enfermedad en el recién nacido puede pasar inadvertida en el momento del nacimiento, pero se puede manifestar meses o incluso años después, siendo la cariorretinitis y alteraciones neurológicas las más comunes. En los casos más graves de toxoplasmosis congénita el recién nacido puede presentar modificación del volumen craneal, calcificaciones intracerebrales y/o convulsiones. En los subclínicos lo ideal sería la demostración de parasitemia en el sangre venosa del neonato. El aislamiento del protozario y la inmunohistoquímica del material de la placenta son también de gran valor para el diagnóstico en gestantes no tratadas. La IgM, en el neonato, significa producción por el mismo. Por esto si no es detectado al inicio, se debe repetir la prueba un mes después del nacimiento ya que la producción de IgM puede ser tardía. Por otro lado, para la realización de la técnica se deben eliminar IgG pues se pueden obtener falsos negativos por acción competidora de estos y factor reumatoideo que produce falsos positivos, lo que es mucho más frecuente en neonatos. Así, la IgG en neonatos debe ser evaluada debido a la IgG materna de transmisión pasiva. La clínica sugestiva en el neonato asociada a un cuadro serológico materno indicativo de infección reciente, tiene valor predictivo de infección congénita. Títulos elevados de IgG en suero del recién-nacido que aumentan o se negativizan, en un período de hasta 18 meses, es indicativo de toxoplasmosis congénita.

MR16. Toxoplasmosis congénita en embarazadas inmunocomprometidas. RIBEIRO, LC.

Hospital Santo Antonio-Rio Grande do Sul, Brasil. Spalding59@hotmail.com.

La incidencia de la enfermedad toxoplasmática en pacientes inmunocomprometidos es elevada, estando en proporción directa con la prevalencia de los anticuerpos específicos anti-*T.gondii* en la población. La toxoplasmosis puede ocurrir de forma diseminada en pacientes

inmunosuprimidas, siendo la forma clínica más frecuente, la cerebral. En los transplantados, en los inmunocomprometidos, especialmente con SIDA, la toxoplasmosis presenta cuadros graves. La toxoplasmosis como infección primaria o como recrudecimiento, en consecuencia de la permanencia de los quistes por período indefinido, tiene importancia en los inmunocomprometidos o en aquellos que sufren inmunosupresión significativa. El desarrollo de la encefalitis toxoplasmática en pacientes con SIDA y la infección por *Toxoplasma* dependen de varios factores, como predisposición genética o virulencia de la cepa. En la mujer inmunocomprometida, la importancia de la toxoplasmosis y su acompañamiento no reside solamente en el desarrollo de la enfermedad, así como también en la posibilidad de gestación y de sus consecuencias. Este acompañamiento, a través del diagnóstico inmunológico, es dificultado por el comportamiento algunas veces anormal del perfil serológico, pero aún cuando se habla en reagudizaciones de infecciones crónicas. La toxoplasmosis congénita, relacionada o no con la inmunosupresión materna tiene gran importancia por la elevada morbilidad que presenta, con secuelas variables, pequeñas o extremadamente graves.

Puntos de abordaje:

- mujeres inmunocomprometidas; - infección primaria
- reagudización de la infección crónica; parámetros diagnósticos
- repercusión fetal.

MR16. Toxoplasmosis ocular. BENCHIMOL E.

Centro de Referência em Infecção Oftalmológica – CRIO; Centro de Pesquisa do Hospital Evandro Chagas – CPqHEC; Fundação Oswaldo Cruz – FIOCRUZ; Ministério da Saúde, Rio de Janeiro – Brasil, ebenchimol@openlink.com.br.

INTRODUCCIÓN – La toxoplasmosis ocular es la más frecuente causa de uveítis posterior en nuestro medio.

DIBUJO – Estudio prospectivo.

OBJETIVO – Estudiar el padrón oro de las lesiones de retinocoroiditis por toxoplasmosis.

CASUÍSTICA Y MÉTODO – Se examinó el protocolo de los pacientes que acudieron al Centro de Referência en Infección Oftalmológica del CPqHEC, en el período de diciembre de 1996 a julio de 1998.

RESULTADOS – Fueron estudiados 93 nuevos pacientes con uveítis posterior de los cuales: 34 (40,97%) con toxoplasmosis; 17 (20,48%) con tuberculosis; 7 (8,43%) con herpes; 13 (15,66%) de causa indeterminada; 1 (1,21%) con sífilis e 11 pacientes (13,25%) no volverán. El 75% de los pacientes con toxoplasmosis ocular tenían edad inferior a 30 años, 61% con queja súbita. Forma exudativa en 84,5% ; lesión recidivada contigua a la lesión cicatricial en 42%; lesión aislada ocurrió en 31% y multifocales en 26%. El contacto con animal doméstico en 41%. En relación a la localización de la lesión activa: zona I con 52%; zona II con 42% y zona III con 6%. El tamaño de la lesión fue menor que un diámetro papilar en 66% y mayor en 34%. En cuanto al tratamiento, 65% cicatrizaron en menos de 2 meses.

CONCLUSIÓN – El estudio clínico descriptivo de las lesiones por toxoplasmosis ocular, es lo dado más importante en la elección del padrón oro de la lesión para el tratamiento específico.

MR17: Diagnóstico de parasitosis por técnicas moleculares

MR17. Siguiendo los rastros del *Trypanosoma cruzi* en la cardiomiopatía chagásica crónica. LEVIN M.

INGEBI-Laboratorio de Biología Molecular de la Enfermedad de Chagas.

La cardiomiopatía chagásica crónica (CChC) es causada por infección con el protozoario parásito *Trypanosoma cruzi*. La respuesta inmunológica humoral anti-*T.cruzi* podría jugar un rol central en su desarrollo. Resultados obtenidos por mediciones en tiempo real (Biacore) indican que los autoepitopes más importantes de la CChC son las 2das regiones extracelulares de los receptores de membrana acoplados a proteína G. Sin embargo, el blanco original de estas reactividades anti-receptor serían las proteínas ribosomales P de *T.cruzi*.

Una evidencia directa del rol de las proteínas ribosomales P del parásito en la inducción de anticuerpos con actividad funcional anti-receptores cardíacos se obtuvo estudiando la respuesta serológica de pacientes con CChC contra las proteínas ribosomales P de bajo peso molecular (proteínas TcP1 y TcP2alfa y β , proteínas de 11 kDa). Los anticuerpos contra estas proteínas se conocen como anticuerpos anti P y son prevalentes en pacientes con CChC. Estos anticuerpos reconocen el péptido C-terminal de las proteínas P de 11 kDa, péptido R13 (1-EEEDDDMGFLFD-13) y tienen la capacidad de inducir un efecto cronotrópico positivo sobre cardiocitos neonatales de rata en cultivo, semejante al efecto causado por anticuerpos anti β 1-adrenérgicos de pacientes chagásicos. En el estudio mencionado demostramos que solo los anticuerpos anti-P producidos contra las proteínas ribosomales P del parásito, y no anticuerpos anti-P de pacientes con enfermedades autoinmunes, tienen la capacidad de estimular receptores β 1-adrenérgicos. La obtención de anticuerpos monoclonales anti-proteínas P de *T.cruzi* con actividad funcional confirman su naturaleza autoreactiva.

Hace varios años estudiamos el genoma humano y el genoma del parásito a partir de tejido cardíaco obtenido de necropsias de pacientes. Inicialmente el estudio se restringía a amplificar genes humanos, β globina, y regiones variables del minicírculo del parásito. Utilizando técnicas de micromanipulación analizamos biopsias cardíacas de pacientes chagásicos. El análisis histológico no reveló presencia *T.cruzi*. Sin embargo preparando el ADN de regiones obtenidas por micromanipulación y por reacciones de amplificación génica anidada (nested PCR), logramos amplificar diversas regiones variables de minicírculo del parásito que fueron secuenciadas. Las secuencias demuestran una gran variabilidad y se reconocieron como pertenecientes a minicírculo por su muy bajo contenido en citidinas, menor al 5%. También se amplificaron secuencias nucleares del parásito. Este trabajo permitió además el estudio del repertorio de IgG en la lesión. Así, se micromanipularon células B aisladas y/o grupos de células plasmáticas, se purificó el ADN correspondiente y se amplificaron, subclonaron y secuenciaron las regiones variables de los genes de las IgG correspondientes. El análisis de las mutaciones somáticas de las regiones variables de las inmunoglobulinas reveló una gran cantidad de mutaciones, lo que indica que las células plasmáticas presentes en la lesión han estado activadas desde mucho antes del momento de la biopsia.

Aunque el *T. cruzi* elude su identificación celular, su rastro puede detectarse con técnicas suficientemente sensibles. Todas las evidencias indican un rol activo del parásito en la génesis de la lesión chagásica.

MR17. Hibridización por Dot Blots y PCR para la detección específica de *Plasmodium vivax* en muestras de sangre y mosquitos. CARNEVALE S.

Departamento de Parasitología Sanitaria. Instituto Nacional de Parasitología. ANLIS "Dr. Carlos G. Malbrán". Buenos Aires. Argentina. jorsil@overnet.com.ar

El paludismo es la enfermedad parasitaria tropical más importante. Cada año se producen en el mundo 300 a 500 millones de casos. En la actualidad 90 países o territorios son considerados maláricos. En las Región de las Américas, los últimos años se han caracterizado por una estratificación de zonas maláricas según riesgo de exposición, vigilancia epidemiológica activa, integración de las actividades de búsqueda, diagnóstico y tratamiento inmediato de casos y control de vectores. Actualmente en Argentina, los casos se producen estacionalmente en los Departamentos de San Martín y Orán, Provincia de Salta, y se deben a *Plasmodium vivax*.

El diagnóstico de malaria está esencialmente basado en la examinación de preparados hemáticos coloreados. Este método es apropiado para el diagnóstico clínico pero difícil de operar para el estudio de áreas. Los test serológicos tales como IFA y ELISA no distinguen entre infecciones previas y recientes. Las técnicas moleculares basadas en hibridización de sondas de ADN y amplificación por PCR han sido desarrolladas para el diagnóstico de paludismo con preponderancia en *Plasmodium falciparum*.

El objetivo de este trabajo es desarrollar un sistema molecular para diagnóstico de paludismo por *Plasmodium vivax*.

Para ello, partiendo de una genoteca de *P. vivax* (cedida por el Dr. H. del Portillo), hemos obtenido secuencias repetitivas de ADN parasitario. Tres de dichas secuencias, de aproximadamente 7000 pb (insPv10), 1500 pb (insPvEC) y 76 pb (insPv10-11), han sido clonadas y están siendo secuenciadas.

Se desarrolló la técnica de Dot Blot empleando muestras sanguíneas humanas (n=70) colectadas en áreas endémicas de Argentina y Bolivia, controles negativos y controles de *P. falciparum*. Este material correspondió a sangre anticoagulada y discos de papel de filtro impregnados (elutorios) a partir del cual se obtuvo ADN. Se emplearon como sondas las secuencias insPv10 e insPv10-11. Los métodos de detección empleados correspondieron a isotópico y no isotópico (colorimétrico y quimioluminiscente). Estos estudios mostraron reacción cruzada de la sonda insPv10 con *P. falciparum*, mientras que insPv10-11 resultó específica para *P. vivax*. Con esta última se efectuó la cuantificación de las señales obtenidas por densitometría y su comparación con parasitemia en extendidos hemáticos, con un $r^2=0.9799$. La técnica de Dot Blot también fue aplicada a muestras de ADN de mosquitos de los géneros *Anopheles* (n=60, colectados en áreas endémicas) y *Culex* (n=17), con resultados poco conclusivos dada la baja intensidad de las señales obtenidas.

Las muestras de sangre y vectores fueron también utilizadas en la técnica de PCR, con diferentes primers. El primer juego (MSP1Fy MSP1R), que amplifica un fragmento de aproximadamente 500 pb del gen de copia única MSP-1 de *P. vivax*, generó resultados positivos en muestras de ADN

obtenidas a partir de sangre conservada a -20°C por períodos menores a 1 año (en muestras de mayor antigüedad los resultados fueron negativos). No se obtuvieron amplicones con mosquitos. Otro set de primers (Pv3F y Pv3R) se empleó para amplificar un fragmento de 400 pb que incluye la secuencia insPv10-11 y se encuentra incluido en insPvEC e insPv10. Las muestras correspondieron a sangre anticoagulada y se obtuvo amplificación sólo en aquellas positivas para *P. vivax*. Con el tercer set de primers (Pv1F y Pv1R) correspondientes a los extremos de insPv10-11 (76 pb), se obtuvieron resultados positivos en la amplificación de ADN de vectores.

La técnica de Dot Blot, aplicada bajo condiciones de detección quimioluminiscente, permitió el diagnóstico específico de *P. vivax* en muestras sanguíneas humanas, incluso aquellas obtenidas por simple punción digital (elutorios), y la cuantificación de señales reveló un alto coeficiente de correlación con el nivel de parasitemia. La técnica de PCR, mediante una combinación de diferentes juegos de primers, resolvió el diagnóstico tanto en muestras de sangre como en mosquitos. Los resultados obtenidos permiten disponer de herramientas moleculares para el diagnóstico poblacional de *Plasmodium vivax* en humanos y vectores.

MR17. Sistemas de detección y tipificación de *Echinococcus granulosus* mediante métodos moleculares. ROSENZVIT, M C.

Departamento de Parasitología Sanitaria, Instituto Nacional de Parasitología, ANLIS "Dr. Carlos G. Malbrán", Buenos Aires, Argentina. marar@anlis.gov.ar

La hidatidosis causada por el parásito cestode *Echinococcus granulosus* afecta la salud pública y la economía de muchos países del mundo. En América del Sur, sigue siendo endémica en Argentina, Uruguay, Brasil (Rio Grande do Sul), Chile y áreas montañosas de Perú y Bolivia.

En los programas de control debe determinarse si el huésped definitivo, por lo general el perro, está infectado con el parásito. El método utilizado es la purga con bromhidrato de arecolina que presenta inconvenientes como baja sensibilidad y dificultad en su aplicación e implica riesgos para el personal involucrado. Otra técnica disponible es la determinación de coproantígenos que es específica y tiene sensibilidad mayor al 90% para altas cargas parasitarias, pero disminuye mucho para perros con menos de 100 parásitos adultos. Con el objetivo de contar con un método para confirmar los resultados obtenidos por coproantígenos y proveer alta sensibilidad y especificidad, se desarrolló un sistema molecular de diagnóstico. Se clonó y caracterizó un elemento repetido del genoma de *E. granulosus* que resultó útil para la detección específica del parásito mediante PCR (PCR-TREG). Debido a la heterogeneidad y presencia de inhibidores de la reacción de PCR en las heces caninas se diseñó un método de extracción que permitió obtener ADN apto para ser utilizado como molde en esta técnica. Para confirmar los resultados obtenidos por PCR-TREG se diseñó una segunda PCR que amplifica un fragmento específico para *E. granulosus* de la subunidad 1 de la citocromo c oxidasa (CO1) mitocondrial.

E. granulosus existe como una serie de cepas que difieren en caracteres como el rango de huéspedes intermedios, incluyendo la infectividad al hombre, la patogenidad y el patrón de desarrollo en el huésped definitivo. Esto debe tenerse en cuenta para el diseño de programas de control y el desarrollo de reactivos de diagnóstico, drogas

quimioterapéuticas y vacunas. Para determinar las cepas circulantes en la región, se analizaron 85 quistes hidatídicos y 9 parásitos adultos de diferentes regiones endémicas de nuestro país, incluyendo además algunas muestras de países limítrofes. La técnica empleada fue secuenciación del gen CO1 para todas las muestras. Con muestras representativas de cada cepa, se realizó además secuenciación del gen mitocondrial NADH 1, RFLP-PCR del espaciador transcripto interno del gen ribosomal nuclear (ITS1 RFLP-PCR) y RFLP-Southern blot con el elemento repetido del genoma parasitario (TREG). Los resultados obtenidos muestran que en Argentina circulan por lo menos cinco cepas de *E. granulosus*: cepa oveja común, oveja de Tasmania, cerdo, vaca y camello. Se encontraron las cepas oveja, oveja de Tasmania y camello en humanos. Esta es la primera vez que la cepa camello se describe como infectiva para el hombre. Además hemos observado variaciones menores intracepa en las muestras de cepa oveja en la secuencia del gen CO1 mitocondrial y en el patrón de hibridación con el elemento repetido TREG. En ensayos adicionales de hibridación con el gen Homeobox 3 y de SSCP de la región 5' no codificante del gen de la malato deshidrogenasa citosólica, también se observó variabilidad, lo que coincide con el mayor rango de huéspedes de esta cepa.

El sistema de diagnóstico desarrollado para detectar al parásito en heces caninas, resultó útil para todas las cepas encontradas, aunque la PCR-TREG fue menos sensible para las cepas oveja y oveja de Tasmania. Los estudios realizados permiten proveer nuevas herramientas a los programas de control y muestran que en nuestros países existe una gran diversidad de variantes de *E. granulosus*. A raíz de los resultados observados hemos emprendido un proyecto con la Universidad Federal de Rio Grande do Sul, para utilizar otros marcadores moleculares en el análisis de la variabilidad genética de *E. granulosus* y relacionarla con la epidemiología y las características patológicas de la hidatidosis. Para realizarlo contamos con la colaboración de profesionales de centros de salud y programas de control de distintas zonas endémicas de la Argentina como las provincias de Jujuy, Tucumán, Río Negro, Chubut, Santa Cruz, Catamarca, Neuquén, Buenos Aires, Santa Fe, Entre Ríos y Corrientes.

MR17. Use of *Echinococcus granulosus* antigen B in the diagnosis of human hydatid disease. ROTT MB, FERNÁNDEZ V, FARIAS S, CHEMALE G, AREND AC, FERREIRA HB, HAAG KL & ZAHA A.

Centro de Biotecnología and Departamento de Biología Molecular e Biotecnología, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Caixa Postal 15005, Porto Alegre, 91501-970, RS, Brasil, zaha@dna.cbiot.ufrgs.br

The genes encoding two different *Echinococcus granulosus* antigen B subunits (AgB8/1 and AgB8/2) were cloned and characterized. Both antigens were expressed in *Escherichia coli* and their diagnostic value were assessed. The genomic sequence of AgB8/1 has a 92 bp intron in the position corresponding to amino acid 16; the AgB8/2 genomic sequence presents a 68 bp intron in the position corresponding to amino acid 20. A comparison between the AgB8/1 and AgB8/2 nucleotide sequences showed a 53.5% identity among exons and a 50% identity between introns. When the native AgB and the two recombinant antigens (rAgB8/1 and rAgB8/2) were tested in an anti-IgG ELISA, the sensitivity of the native antigen B was 77.41% and its specificity was 81.9%, while rAgB8/1 showed 54.84% of sensitivity and

80.17% of specificity and rAgB8/2 had an 83.87% sensitivity and a 98.28% specificity. The presence of additional copies of these genes in the parasite genome was tested by low stringency and high fidelity PCR amplifications from parasite genomic DNA and cDNA derived from protoscoleces, using primers designed from the AgB8/1 and AgB8/2 sequences. We have identified three genomic and three cDNA sequences closely related to but different from the AgB8/1 sequence previously characterized.

MR18: Aspectos clínicos y fisiopatológicos de la infección por protozoarios

MR18. Toxoplasmosis Congénita. ALTCHER J.

Parasitología, Hospital de Niños Ricardo Gutiérrez, Buenos Aires. jaltcheg@intramed.net.ar

La Toxoplasmosis congénita solo es posible si se produce una infección aguda durante la gestación. Dado que la misma suele cursar en forma asintomática el diagnóstico se debe realizar mediante el screening serológico. En nuestro país este estudio no es obligatorio. Alrededor del 60% de las mujeres en edad fértil presentan serología reactiva. Se desconoce la real incidencia de la infección aguda durante el embarazo en Argentina.

Presentamos los datos clínicos y de laboratorio de 32 niños asistidos en los últimos 5 años en nuestro servicio.

Criterio diagnóstico: Persistencia Ac IgG a los 7 meses de edad, madre con serología reactiva. Estudios serológicos realizados: EIA IgG, HAI, AD, EIA por inmunocaptura IgM e IgA.

Población: n: 32, Edad: 15d - 2a, x: 8 meses, RNT: 21 (66%), Peso x: 2980g.

BPEG: 8 (25%). Antecedente de estudio serológico materno durante la gestación 7(22%). Datos clínicos: Afectación ocular 27 (81%) dado por coriorretinitis 25, estrabismo 17, nistagmus 7, microftalmía 2, cataratas 2

El compromiso fue bilateral en 17(62%). Calcificaciones cerebrales 13(40%) retraso madurativo 10(31%), microcefalia, hidrocefalia 9(28%), convulsiones 4 (12.5%), hepatomegalia 7(21%), ictericia (BID) 5(15%), sme purpúrico c/plaquetopenia 3(9.3%), déficit auditivo 2(6.2%).

Nuestra experiencia demuestra un inadecuado estudio de la embarazada donde el tratamiento de la infección toxoplásmica aguda disminuiría la morbilidad fetal. Se observó un diagnóstico tardío por una inadecuada valoración de los síntomas oculares por parte del pediatra.

MR18. Patogenia y valor del tratamiento prenatal de la toxoplasmosis. Nuevos aspectos. HIRT J.

Centro de Toxoplasmosis. Hospital Alemán. Buenos Aires-Argentina. hirtjc@infovia.com.ar

La primoinfección toxoplásmica accecida durante el embarazo puede transmitirse al feto a través de la placenta, constituyendo una de las más importantes causas de infección prenatal. En el neonato el espectro clínico de la toxoplasmosis congénita es muy amplio y varía desde la infección asintomática -que es lo más frecuente, y que en el 60 a 80% de los casos desarrollan una retinocoroiditis- hasta lesiones neurológicas que pueden ser invalidantes con importantes consecuencias socio-económicas. En condiciones inmunitarias normales, la parasitemia está ligada a la primoinfección y es condición para que los toxoplasmas lle-

gueda a la placenta causando placentitis. La infección placentaria y fetal aumenta del primero al tercer trimestre de la gestación. La infección toxoplásmica conduce a un estado de inmunidad de premunición que persiste de por vida. La inmunidad celular es el principal mecanismo para el control de la infección. Se considera que la parasitemia es breve. La duración del período de incubación prenatal, lapso que transcurre entre la infección materna y la fetal, es incierto y se acepta que se acorta del primero al tercer trimestre de la gestación, pero sería suficiente como para permitir un diagnóstico oportuno y un tratamiento eficaz para impedir la transmisión vertical. Trabajos recientes ponen en duda estas afirmaciones. La placentitis habitualmente cura, o bien los toxoplasmas se enquistan. El 43% de los neonatos infectados asintomáticos presentan parasitemias. Por ello se presume que los quistes podrían eclosionar sub parto infectando al niño. Hay una estrecha relación entre la infección del feto y el aislamiento de toxoplasmas de la placenta (5% de positivos falsos). La frecuencia con que se aíslan toxoplasmas de la placenta está en relación con el momento del embarazo en que se produce la infección materna y el tratamiento instituido. Se acepta que en la embarazada hay cierta inmunodepresión. Medida la inmunidad celular mediante la cutirreacción, este mecanismo tarda en ser eficaz. Los factores que favorecen o que limitan la transmisión vertical y el cuadro resultante son poco conocidos. Se ignora si dependen del sistema inmunitario materno, del fetal, de condiciones placentarias, o bien del agente. En forma esquemática, los daños en el feto como consecuencia de la primoinfección materna estarían condicionados por los siguientes factores: a) *El parásito, la masividad de la infección y la virulencia de los gérmenes.* Es un hecho que la forma evolutiva del parásito influye en la gravedad del cuadro clínico de la infección. Mediante técnicas moleculares se han podido demostrar variaciones de la estructura genética de los toxoplasmas, habiéndose identificado 3 líneas clonales mayores que se pudieron relacionar con la virulencia del agente en animales de experimentación: Tipo 1: con alta virulencia para el ratón. En el humano éste estaría presente en la toxoplasmosis congénita. Werner, ya había enunciado la hipótesis de cepas con un tropismo especial por el aparato genital y el feto. Tipo 2: causa patología crónica en cepas susceptibles de ratón. En el humano sería el causante de las lesiones con tendencia a reactivarse. Tipo 3: es la menos virulenta para el ratón. Ambroise-Thomas recomienda ser cauto en extrapolar al humano los resultados experimentales de laboratorio. b) *Capacidad de defensa de la madre.* En el huésped, factores genéticos e inmunológicos determinarían la susceptibilidad a la infección. c) *Factores inmunitarios fetales.* La inmadurez del sistema inmunológico en vías de desarrollo hace al feto más o menos susceptible frente al parásito. La inmunidad celular es el mecanismo de defensa más importante frente a *Toxoplasma gondii*. Los timocitos se desarrollan recién a partir del tercer trimestre. Las IgM, IgA e IgE hacen su aparición después de las 22 semanas. d) *Tiempo de incubación prenatal.* e) *La edad del feto al momento de la invasión del feto.*

Hay pocos estudios comparables entre grupos de primoinfectadas con y sin tratamiento, y no hay estudios randomizados con grupo placebo. Los estudios de Desmonts demostraban una reducción del 60% de niños infectados en el grupo tratado. Dado que la tasa de transmisión vertical varía durante el embarazo ello podría haber conducido a conclusiones erradas. Estudios recientes no pudieron confirmar los datos de Desmonts; sí comprobaron un evidente

efecto terapéutico al mitigar la acción lesional del parásito. **Es el consenso que toda embarazada que se primoinfecta debe ser tratada. El tratamiento de elección es la combinación de pirimetamina con sulfadiazina.**

MR18. Aspectos fisiopatológicos del paludismo grave y su importancia en los viajeros. ORDUNA T.

Patologías Regionales y Medicina Tropical (CEMPRA-MT), Hospital de Infecciosas F.J. Muñiz, Buenos Aires, Argentina. torduna@intramed.net.ar

El Paludismo o Malaria es la hemo-histoparasitosis más importante a nivel mundial en virtud de su elevada incidencia (entre 300 y 500 millones de casos / año) y la alta letalidad que provoca, principalmente en niños menores de 5 años, superior a 2 millones de muertes / año. (OMS). Es producido por protozoarios del género *Plasmodium* y transmitida por la picadura de mosquitos infectados del género *Anopheles*. Las especies que pueden parasitar al hombre son: *vivax*, *falciparum*, *ovale* y *malariae*. La casi totalidad de los cuadros graves y/o mortales de paludismo se deben a *P. falciparum*, parásito que se encuentra en todas las áreas maláricas, aunque con mayor frecuencia en el África subsahariana y en el Sudeste asiático. Fisiopatológicamente esta especie puede desencadenar una serie de eventos que conducen en su evolución natural a la aparición de complicaciones que definen el llamado "Paludismo severo o grave", el cual suele observarse en los niños y embarazadas de áreas endémicas, y en las personas que se trasladan a dichas áreas desde zonas donde no existe esta parasitosis (personas no inmunes). Cada año se calcula que más de 30 millones de individuos de regiones libres de malaria visitan zonas maláricas, de las cuales más de 30000 adquieren paludismo. La falta total de inmunidad frente a *P. falciparum* que presentan los viajeros de países o regiones libres de paludismo se convierte en un elemento clave para el potencial desarrollo del cuadro clínico grave, sumado ello a los particulares mecanismos fisiopatológicos que puede desencadenar esta especie de *Plasmodium*: 1) hiperparasitemia (más de 5 % de glóbulos rojos infectados) con la consecuente hemólisis masiva de elementos parasitados; 2) aumento de la citoaderencia de los glóbulos rojos infectados (GRI) a los endotelios de la microvascularización (de mayor importancia en órganos nobles), en función de la expresión de moléculas de adhesión eritrocitarias ("knobs") y endoteliales, disminución de la deformabilidad de los GRI y aparición del fenómeno de "rosetas"; 3) inducción de liberación de elevadas cantidades de citoquinas, de las cuales la mejor estudiada es el FNT-alfa en relación a la aparición de compromiso cerebral (paludismo cerebral), aunque también se consideran de importancia IL-1, IL-6 e IL-8; 4) aumento de la permeabilidad vascular; 5) posibles fenómenos inmunológicos no bien precisados aún. Clínicamente lo expresado puede manifestarse como: anemia severa, paludismo cerebral (coma), edema agudo de pulmón, insuficiencia renal aguda, insuficiencia hepática, coagulación intravascular diseminada, hipoglucemia y colapso circulatorio. Es por todo lo mencionado que esta parasitosis se convierte en una de las principales amenazas para los viajeros a áreas tropicales, razón por la cual es importante enfatizar la necesidad de una adecuada profilaxis que contemple: exposición al riesgo de adquirir paludismo, medidas de protección individual anti-insectos, quimioprofilaxis según características personales y del mapeo de resistencia a fármacos, eventual portación de medicación para

autotratamiento. Por último, es necesario recordar un axioma que continúa vigente: "todo paciente con cuadro febril y antecedente de exposición a áreas maláricas tiene paludismo mientras no se demuestre lo contrario". En caso de no contar con adecuado diagnóstico de la especie causante del cuadro clínico pensar que se debe a *P.falciparum*, y además considerarlo resistente a múltiples drogas, por lo que habrá que implementar un esquema terapéutico que se adaptará a los fármacos con que se cuente en el lugar, e internar al paciente, de ser posible, en la Unidad de Cuidados Intensivos. "La muerte por infección palúdica es prevenible": el diagnóstico precoz, tratamiento adecuado y un buen soporte asistencial son factores claves en el pronóstico del paludismo severo.

MR18. Mecanismos de lesión miocárdica en la enfermedad de Chagas. POSTAN M, ARNAIZ MR, ALBAREDA C, FICHERA LE.

Instituto Nacional de Parasitología Dr. M Fátala Chabeni ANLIS Malbrán, Buenos Aires, Argentina.

Unos de los aspectos más importantes de la enfermedad de Chagas es el desarrollo de lesiones cardíacas progresivas, las cuales pueden manifestarse clínicamente durante las fases aguda y crónica de la infección por el *T. cruzi*, o permanecer silenciosas en la fase indeterminada. Las lesiones cardíacas que caracterizan a las distintas fases de esta enfermedad han sido bien documentadas en la literatura por diferentes autores. Estas consisten principalmente en la presencia de nidos de amastigotes intracelulares y necrosis de fibras miocárdicas, asociadas a un proceso inflamatorio de variable intensidad en la fase aguda, y acompañados por fibrosis e hipertrofia miocárdica en la etapa crónica. Un aspecto peculiar de esta patología es la alternancia de lesiones histológicas en diferentes estadios de evolución localizadas en distintas áreas de un mismo corazón, indicando el carácter activo y progresivo de la enfermedad. La patogénesis de las lesiones cardíacas no es conocida aún en su totalidad, habiéndose propuesto en su desarrollo mecanismos parasitológicos, inmunológicos, vasculares y neurovegetativos, no mutuamente excluyentes. Durante la etapa aguda, la necrosis celular e inflamación miocárdica están relacionadas directamente a la presencia de amastigotes en los tejidos, aunque el daño se extiende más allá de las células comprometidas por el parásito, involucrando estructuras musculares, intersticiales, vasculares y nerviosas adyacentes. La respuesta inmune local es frecuentemente de una intensidad exagerada en relación a la cantidad de parásitos presentes. Es posible que mediadores químicos como el óxido nítrico, liberado por las células inflamatorias y miocitos cardíacos, bajo estímulo de citoquinas producidas localmente, estén involucrados en la magnificación del daño miocárdico. Por otro lado, esta respuesta inmune es efectiva para el control de la multiplicación parasitaria, aunque no suficiente para su completa eliminación. Varios autores han demostrado la presencia de anticuerpos que reaccionan con antígenos del parásito y de componentes cardíacos humanos, generados probablemente a partir de la necrosis de las fibras miocárdicas. Este fenómeno autoinmune sería responsable de la perpetuación del proceso inflamatorio cardíaco en forma independiente de la presencia local del parásito. Otros estudios indican además que las citoquinas producidas por las células inflamatorias inducirían la sobreexpresión de moléculas de histocompatibilidad clase I por los miocitos cardíacos, aumentando la exposición de sus antígenos propios a los linfocitos

T citotóxicos. Sin embargo, la autoinmunidad no explicaría algunos aspectos de la enfermedad tales como el carácter multifocal de las lesiones, la regresión del proceso inflamatorio luego de controlada la multiplicación parasitaria ni su exacerbación por inmunosupresión. Actualmente, varios autores sostienen que la presencia del parásito en las lesiones es condición fundamental para la génesis y perpetuación del proceso inflamatorio, como lo demuestran la persistencia de ADN y antígenos parasitarios en las lesiones cardíacas de pacientes chagásicos crónicos. Este concepto es reforzado por la mejor evolución de la enfermedad lograda mediante tratamiento específico contra el *T. cruzi*. También existen factores relacionados a las fibras musculares y vasculares que estarían involucrados en el desarrollo de la patología cardíaca, específicamente en la remodelación miocárdica, en la génesis de la fibrosis y la formación del aneurisma apical, distintivos de la miocardiopatía chagásica crónica.

Referencias

- Higuchi ML, 1999. Human chronic chagasic cardiopathy. Participation of parasite antigens, subsets of lymphocytes, cytokines and microvascular abnormalities. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 94 (Suppl I):263-267
- Kalil J, Cunha-Neto E, 1996. Autoimmunity in Chagas' disease cardiomyopathy: Fulfilling the criteria at last? *Parasitol Today* 12:396-399
- Laguens RP, Cabeza Meckert PM, Vigliano CA, 1999. Patogenia de la miocarditis chagásica crónica humana. *Medicina* (Buenos Aires) 59 (Supl II): 63-69.
- Postan M, Arnaiz MR, Fichera LE, 1999. Respuesta de las células musculares cardíacas a la infección por *T. cruzi*. *Medicina* (Buenos Aires) 59 (Supl. II):57-62
- Tarleton RL, Zhang L, 1999. Chagas' disease etiology: Autoimmunity or parasite persistence?. *Parasitol Today* 15:94-99

MR19: Quimioterapia

MR19. Desarrollo de nuevos quimioterapéuticos. Toxicidad y modo de acción sobre el *Trypanosoma cruzi* de derivados de la oxazolo(tiazol)piridina y del nitroimidazol. MAYA JD, REPETTO Y, MORELLO A.

Programa de Farmacología Molecular y Clínica, ICBM, Facultad de Medicina, Universidad de Chile. Santiago de Chile. : amorello@machi.med.uchile.cl

La Enfermedad de Chagas es un permanente problema terapéutico debido a que las drogas usadas actualmente, como son el nifurtimox y el benznidazol, poseen efectos tóxicos.

El alopurinol y agentes antimicóticos han sido usados en pacientes con un relativo éxito. Numerosos compuestos naturales y sintéticos han sido estudiados al nivel de laboratorio como agentes antichagásicos, pero su eficacia en humanos no ha sido adecuada por carencia de potencia o por alta toxicidad.

En esta comunicación informamos de los resultados obtenidos con derivados de la oxazolo(tiazol)piridina y del nitroimidazol.

Una serie de derivados de oxazolo(tiazol)piridina fueron estudiados a través de sus potenciales redox, lipofiliidad, inhibición del crecimiento en cultivo de epimastigotes de *Trypanosoma cruzi*, inhibición de la respiración celular y pruebas de toxicidad. La inhibición de la respiración parece

ser la causa de su actividad anti-*T. cruzi*, ya que se encontró correlación entre este parámetro y la inhibición del crecimiento. También se encontró una buena correlación entre la facilidad de oxidación de los compuestos y su lipofilidad con la inhibición del crecimiento y su toxicidad. Es posible que su acción este mediada por la generación de radicales libres derivados de estas drogas, pues no se ha demostrado que las dihidropiridinas afecten las concentraciones de calcio intracelulares y por lo tanto no comparten esta acción con lo observado en células de músculo liso de mamíferos.

Otra serie, de 2-nitroimidazoles, 5-nitroimidazoles y nitrofuranos fueron estudiadas. Todos los nitrocompuestos estudiados disminuyeron la concentración de tripanotión reducido en los parásitos indicando un estrés oxidativo. Algunos de ellos inhibieron la respiración del parásito en un modo dependiente del tiempo. El megalozol, el benznidazol y otros nitroimidazoles inhibieron la respiración del parásito, en cambio el nifurtimox y otros nitrofuranos produjeron reciclaje redox con el oxígeno. Estos resultados apoyan lo reportado previamente y permiten concluir que la generación de radicales libres derivados del oxígeno, así como radicales y metabolitos electrofílicos derivados de estas drogas, conducirían a la disminución de las defensas redox del parásito contribuyendo de esta manera a explicar su efecto tóxico.

En todos esos estudios no se detectaron diferencias significativas entre las cepas Tulahuén, LQ y el clon Brener.

Financiado en parte por SIDA/SAREC y DID U. de Chile.

MR19. Tratamiento de la enfermedad de Chagas experimental con inhibidores de proteasas. DOYLE PS, HSIEH I, MCKERROW JM y ENGEL JC.

Tropical Diseases Research Unit, Department of Pathology, University of California, San Francisco, VA Medical Center. 4150 Clement Street, Rm 113B, San Francisco, CA 94121, USA. pdoyle@cgl.ucsf.edu.

La enfermedad de Chagas se subdivide en las fases aguda, indeterminada y crónica. Debido a la toxicidad de los fármacos, el tratamiento tradicional con benznidazol o nifurtimox se restringe generalmente a la fase aguda. Sin embargo, avances médicos y experimentales recientes demuestran que el tratamiento del Chagas crónico disminuye la patología cardíaca. Nuestro grupo estudia el tratamiento experimental con péptido-miméticos que inhiben cruzaina. El tratamiento de animales experimentales con inhibidores de cisteína proteasas (CPI) trae aparejados disminución de la mortandad y ausencia de la típica patología chagásica aguda. Los CPI interrumpen el ciclo intracelular del *T. cruzi*, alterando el tráfico de la cruzaina a través del complejo de Golgi y su localización final en los lisosomas. Uno de estos compuestos, N-pip-F-hF-VS??? se encuentra en la etapa de evaluación pre-clínica en tres modelos animales.

En este trabajo presentamos la evolución de la infección al año post-infección en animales tratados con una baja dosis (50 mg/kg peso) de N-pip-F-hF-VS? durante la fase aguda y no tratados (controles). Los animales se infectaron con una baja dosis (10^4 tripomastigotes) del clon CA-I/72 de *T. cruzi*, que infecta preferentemente los músculos cardíaco y esquelético. Los controles presentaron un edema generalizado durante la fase aguda, aspecto que no se observó en ninguno de los animales tratados. El tratamiento aumentó el porcentaje de supervivencia de los animales, registrándose un 13% de mortalidad en ratones tratados versus 33% en controles no tratados. Seis/9 ratones controles y 12/14 animales tratados sobrevivieron hasta la etapa crónica (1 año

post-infección). Los controles presentaron anorexia y un estado general extremadamente debilitado. El estudio histopatológico de los controles no tratados mostró una intensa infiltración linfocitaria en 5/6 ratones, con inflamación focal y calcificación del músculo cardíaco en algunos casos. También se evidenció una notoria atrofia del músculo esquelético en todos los animales y parálisis de los miembros posteriores en 2/6 ratones. El único animal sin cardiopatología presentó parálisis de miembros posteriores con intensa inflamación de músculo esquelético.

En cambio, los animales tratados mostraron un aspecto general normal y activo, así como ausencia de debilidad y/o parálisis en miembros posteriores. Sin embargo, 3/12 animales tratados presentaron inflamación y escasos amastigotes en músculo cardíaco y una leve inflamación focal en el músculo esquelético.

A continuación estudiamos comparativamente la patogenicidad en animales de parásitos resistentes a N-pip-F-hF-VS? (CA-I/KR) y sensibles (CA-I/72; controles). Mientras que una dosis letal del clon CA-I/72 produjo la muerte del 100% de los ratones un mes post infección, todos los animales inoculados con igual dosis del clon CA-I/KR sobrevivieron sin ninguna evidencia de patología. La histopatología de estos animales mostró ausencia de nidos de amastigotes y de inflamación e infiltración tisulares. Estos resultados sugieren que parásitos resistentes al tratamiento con CPI serían menos virulentos y patogénicos.

MR19. Tratamiento con benznidazol en pacientes en Fase Indeterminada de la infección con *Trypanosoma cruzi*: Eficacia y Tolerancia. Seguimiento a largo plazo. SOSA-ESTANI S, CURA EN, SEGURA EL.

Centro Nacional de Diagnóstico e Investigación de Endemioepidemias (CeNDIE), Centro Nacional de Control de Calidad de Biológicos (CNCCB)/ANLIS «Dr. Carlos G. Malbrán». Ministerio de Salud, Buenos Aires, Argentina. ssosaestani@abaconet.com.ar

En las Américas hay aproximadamente 16 millones de pacientes que padecen la Enfermedad de Chagas en sus Fases Indeterminada (FI) y Crónica (FC). Hay una necesidad de contar con una segura y efectiva terapia contra la infección con *Trypanosoma cruzi*. El Nifurtimox y el Benznidazol (Bz) fueron inicialmente ensayados para la Fase Aguda y luego para las FI y FC. Posteriormente el tratamiento dejó de ser recomendado en las FI y FC. Coincidiendo con el inicio del Control de la transmisión del *T. cruzi* en el Cono Sur de América, nosotros y otros autores en investigaciones realizadas en Argentina y Brasil, hemos demostrado por ensayos clínicos y observaciones retrospectivas, el efecto del tratamiento etiológico en las FI y FC. Estos estudios mostraron el decrecimiento de los títulos de anticuerpos con serología con control de calidad (Viotti 1994, de Andrade 1996, Sosa Estani 1998, 1999); negativización serológica del 60% usando antígeno recombinante (Sosa Estani 1998) o con una mucina purificada de tripomastigotes (de Andrade 1996, Almeida 1999); negativización de xenodiagnóstico (Sosa Estani 1998, 1999); y una disminución significativa de la concentración plasmática de p-Selectin (Molécula de Adhesión) (Laucella 1999). Observaciones clínicas han demostrado una mejor evolución entre pacientes en FI y FC que hayan recibido el tratamiento comparado con los pacientes no tratados (Viotti 1994, de Andrade 1996, Sosa R 1997). En Mayo de 2000 evaluamos 81 pacientes entre 6-14 años de edad seguidos durante 108 meses. La observación se efectuó en 3 grupos, Grupo I (GI) Tratados en 1991 con Bz

5 mg/kg días x 60 días, n=36; Grupo II (GII) Tratados en 1991 con Bz 5 mg/kg días x 30 días, n=10; Grupo III (GIII) Tratados en 1997 con Bz 5 mg/kg días x 30 días, n=7; y Grupo IV (GIV) No tratados, n=18. No se observaron en el examen clínico signos o síntomas patológicos en el sistema cardiovascular, digestivo, neurológicos y locomotor asociados al tratamiento etiológico. El laboratorio clínico mostró valores medios normales y sin diferencia entre los 4 grupos en el hemograma, bilirubinemia y transaminasas séricas. La prevalencia de pacientes con serología reactiva (ELISA e IFI) después de 108 meses fue de 11,1%; 20,0%; 71,4% y 72,2% para los grupos GI, GII, GIII y GIV respectivamente ($p < 0,05$; GL 3). La media (DS) del Log_2 de las diluciones de la IFI fueron 1,6($\pm 2,3$); 1,6($\pm 2,6$); 4,7($\pm 2,3$); 5,1($\pm 2,9$) para los GI, GII, GIII y GIV respectivamente ($p < 0,05$). La media (DS) de las D.O. para 490 nm en la ELISA fueron 0,154($\pm 0,088$); 0,159($\pm 0,070$); 0,262($\pm 0,092$); 0,293($\pm 0,095$) para los GI, GII, GIII y GIV respectivamente ($p < 0,05$). Se efectuaron electrocardiogramas cuyos resultados están actualmente en análisis. En este seguimiento comprobamos con la serológica convencional las diferencias entre pacientes tratados hace 9 años, comparados con pacientes recientemente tratados o no tratados. Asimismo la ausencia de efectos indeseables a largo plazo debidos al tratamiento con Bz. En nuestra experiencia la tolerancia del tratamiento fue buena, siempre bajo monitoreo. Los pacientes no mostraron efectos adversos graves. Observamos manifestaciones dérmicas y gástricas, y menos frecuente neurotoxicidad periférica. Pruebas de laboratorios muestran valores de bilirubina normal y raramente elevación de transaminasas sin alcanzar el grado de hepatitis tóxica medicamentosa. Hemos observado 1 caso de leucopenia entre mas de 600 pacientes tratados. Los efectos adversos son mas frecuentes en adultos que en niños. En todos los casos desaparecieron al disminuir la dosis o suspender el tratamiento. La evaluación de la eficacia a través de métodos serológicos es un proceso dinámico que depende de: la herramienta utilizada, edad del paciente al recibir el tratamiento, tiempo transcurrido entre el tratamiento y el momento del control, y el tiempo que lleva de infectado, información esta difícil de determinar. La investigación de mejores medicamentos que los utilizados hasta el momento para buscar la solución para 16 millones de personas infectadas es un desafío para los investigadores de América. Mientras tanto, el Benznidazol y el Nifurtimox continúan siendo las mejores alternativas estudiadas.

MR19. Tratamiento antihelmíntico masivo: experiencia en barrios marginales de Santa Fe. BELTRAMINO D, LURA M C*, CARRERA E*, GHIRIMOLDI N, ALVAREZ O, LATORRE M G*, NEPOTE A*, RICO M*, GIUGNI MC*, BOT B*, SPAGNA A*

Hosp. J. B. Iturraspe, * F.Bqca. y Cs.Biológ. (UNL); Santa Fe, Argentina. mclura@fcb.unl.edu.ar
dbeltramino@arnet.com.ar.

Introducción: La OMS reconoce como efectivo el tratamiento antihelmíntico masivo de la población que habita en estratos con una prevalencia de geohelminthos > 50% (Montesor A y col., 1998) El objetivo del presente trabajo fue comparar la evolución, durante 12 meses, de la prevalencia e intensidad de la infección parasitaria por geohelminthos en niños pertenecientes a dos comunidades hiperendémicas semejantes (300-500 niños), una de las cuales recibió tratamiento masivo (A), mientras que la otra (B), el tratamiento individual, por demanda espontánea, tradicionalmente empleado.

Materiales y Métodos: Se trabajó con niños entre 2 y 12 años, seleccionados aleatoriamente. Cada niño, previo a su ingreso al protocolo, contó con una autorización escrita de sus padres. Los niños pertenecientes a A fueron tratados masivamente con 500 mg de mebendazol, en dos oportunidades, con 6 meses de diferencia; en B recibieron tratamiento sólo aquellos a los que se les observaron geohelminthos en sus heces. En aquellos casos en que se detectó otro tipo de parásitos se suministró el antiparasitario adecuado. Al comienzo del estudio y antes de la 2° dosis del tratamiento, se determinaron, para cada niño, la prevalencia e intensidad de las infecciones por helmintos mediante coproparasitológicos directos y Kato-Katz (OMS, 1994)

Resultados: En A (n = 44), el 91 % de los niños tenía helmintos en sus heces, siendo el 84 % geohelminthos. Previo a la 2° dosis, los porcentajes respectivos fueron, 44% y 26%, existiendo diferencias significativas ($p < 10^{-3}$ y $p < 10^{-6}$), entre la proporción de parasitados con helmintos y geohelminthos, respectivamente. La disminución en la intensidad de las infecciones por *Ascaris lumbricoides* y *Trichuris trichiura* fue estadísticamente significativa ($p < 10^{-3}$) En B (n = 50), al inicio del estudio, el 72% tenía helmintos, de los cuales el 62 % eran geohelminthos. Previo a la 2° dosis, los porcentajes respectivos fueron 57% y 48 %, no detectándose diferencias significativas.

Conclusiones: Estos resultados permiten inferir que, en nuestro medio, la prevalencia e intensidad de las geohelminthosis, pueden reducirse, suministrando antiparasitarios en dosis únicas y repetidas.

MR19. Búsqueda activa del paciente asintomático portador de quiste hidatídico. DEL CARPIO MELGAR M, PANOMARENKO O, COSTA MT.

Hospital Dr. Rogelio Cortizo. Ing. Jacobacci. Río Negro, Argentina. cuburucoستا@bariloche.com.ar.

Se evalúa la ecografía de campo como método de elección para el diagnóstico del paciente asintomático portador de quiste hidatídico hepático, en regiones con alta prevalencia de la provincia de Río Negro; asociado a los programas de atención médica primaria. Se evalúa su sensibilidad, especificidad y valor predictivo ponderado de la U.S. con operador no especializado y equipo de tecnología media; mostrándose algoritmo de tratamiento adoptado en la provincia de Río Negro con especial referencia a quimioterapia y P.A.I.R. Se muestran resultados e indicaciones de acuerdo a tamaño, localización y tipo de quiste. Se refiere especialmente evitar la rotulación del paciente y ofrecer una alternativa que pueda mejorar la morbimortalidad del paciente tratado en su estadio sintomático.

MR20: Parásitos contaminantes de aguas y suelos

MR20. Importancia de la contaminación parasitaria de agua. Aspectos metodológicos. ABRAMOVICH B.

Sección Aguas. Fac. Bioquímica y Cs.Biológicas (UNL). Santa Fe, Argentina. blerman@fcb.unl.edu.ar

Desde hace aproximadamente dos décadas se ha reconocido a nivel mundial, un predominio de parásitos y virus como agentes causantes de brotes de origen hídrico. Esto es debido a que los criterios de calidad de agua, así como los tratamientos de potabilización, han sido orientados a evitar enfermedades bacterianas.

La remoción de enteroparásitos, constituye un desafío para las plantas de tratamiento, debido a que, si sobrepasan las barreras físicas de sedimentación y filtración, la desinfección es poco efectiva para eliminarlos. *Giardia lamblia* y *Cryptosporidium parvum* han causado varios brotes documentados de enfermedades intestinales asociadas al agua potable.

Si bien la mayor parte de los registros se han realizado en países desarrollados, seguramente su presencia y concentración en el agua es mayor en los países en desarrollo, debido a las condiciones sanitarias deficientes y la falta de tratamiento de los líquidos cloacales.

Los quistes de *Giardia* pueden provenir sobre todo de efluentes cloacales, por aporte continuo de portadores o enfermos. La mayor ocurrencia de *Cryptosporidium* puede ser debida a escurrimientos agrícolas, que arrastran materia fecal de ganado vacuno, importante reservorio de este parásito.

Además de los parásitos citados, en los últimos años se ha destacado la importancia de la transmisión a través del agua de parásitos emergentes como: *Clycospora cayetanensis*, Microsporidios, *Isospora belli*, *Toxoplasma gondii*.

Aspectos metodológicos: La dificultad que presenta el monitoreo de parásitos en aguas se debe a: su pequeño tamaño; baja concentración en la mayoría de los medios acuáticos, incapacidad de cultivo in vitro, interferencia con otras partículas y sedimentos.

Debido a los bajos niveles presentes en el agua, se debe proceder a concentrar grandes volúmenes de muestra a través de filtros de membrana o más efectivamente empleando filtros de cartucho de hilo de polipropileno de 1mm de porosidad nominal. Luego de un proceso de clarificación con solución de Percoll-sucrosa, se realiza la identificación de quistes y oquistes por inmunofluorescencia aplicando anticuerpos monoclonales. La confirmación de la estructura interna de los mismos se efectúa con microscopio de contraste de fase o por contraste de interferencia diferencial(DIC).

Otros métodos que pueden emplearse son:

PCR: Se lleva a cabo la detección de ácidos nucleicos de los parásitos por técnicas de biología molecular (Reacción en cadena de la polimerasa). Los inconvenientes son la falta de cuantificación y de comprobación de la viabilidad.

Separación inmunomagnética: La técnica de anticuerpos ligados a partículas magnéticas puede ser usada para capturar selectivamente a estos microorganismos, cuantificándolos luego con un microscopio de epifluorescencia.

Citometría de flujo: Luego de la aplicación de anticuerpos conjugados (IFA), puede emplearse citometría de flujo para separar las partículas cuyas características son compatibles con el parásito buscado y utilizar microscopio de epifluorescencia para su identificación final.

La viabilidad de los quistes y oquistes no es posible llevar a la práctica mediante las técnicas de exquistación in vitro ni por infectividad con animales, debido al bajo número de parásitos en aguas. Por esta razón se emplea la inclusión o exclusión de colorantes vitales:

DAPI(4',6- diamidino-2-phenylindole): Colorante selectivo de ADN. **PI (Ioduro de propidium):** Es capaz de atravesar sólo las membranas celulares dañadas, uniéndose a los ácidos nucleicos de las células muertas. La detección y cuantificación de parásitos permite la vigilancia de las fuentes de provisión de agua a través de una base de datos, a fin de establecer un tratamiento adecuado para minimizar el riesgo de transmisión de estos microorganismos.

MR20. Parásitos en aguas de recreación. Correlación con parámetros de calidad de aguas. LURA MC, GILLI MI, HAYE M, CARRERA E, NEPOTE A, ABRAMOVICH B.

Fac. de Bioquímica y Ciencias Biológicas (U.N. del Litoral) Santa Fe; Argentina; mclura@fbc.unl.edu.ar

Introducción: La contaminación de las aguas ambientales constituye una de las mayores preocupaciones a nivel mundial. En los últimos años se ha tornado relevante la detección de enteroparásitos como *Giardia* y *Cryptosporidium*. Debido a que estos microorganismos pueden transformarse en un problema de salud pública, se considera importante su detección en aguas superficiales, habiéndose descrito numerosos brotes de diarrea por estos parásitos transmitidos por el agua. (Fayer y col, 86; Rose, 88; García Bruckner, 97)

Objetivos: Investigar la presencia y concentración de *Giardia* y *Cryptosporidium* en aguas de recreación y determinar su correlación con indicadores físico-químicos y bacteriológicos de contaminación.

Materiales y Métodos: El estudio se llevó a cabo durante la temporada Marzo/ 98- Diciembre/ 99. Se analizaron muestras (n= 32) provenientes de tres balnearios. Dos de ellos pertenecientes a la laguna Setúbal y el tercero a la costa del río Salado. El estudio de los parámetros físico-químicos y bacteriológicos se llevó a cabo según las pautas estipuladas por Standard Methods (APHA, 1995) La identificación de los parásitos se realizó por inmuno-fluorescencia, utilizando anticuerpos monoclonales. El límite de detección de la técnica utilizada fue de 20 organismos/ 100 litros. Desde el punto de vista estadístico, se efectuaron análisis de regresión, calculándose el coeficiente de determinación muestral, el coeficiente de correlación de Spearman y su significancia estadística. Cuando los datos no se ajustaban a la distribución normal, se aplicó el test de Mann-Whitney.

Resultados: *Cryptosporidium* fue detectado en el 100 % de las muestras, en concentraciones que variaron entre 44-2.404 oquistes/ 100 litros de agua. Con menor frecuencia se detectaron quistes de *Giardia* (72%), en un rango cuyos valores mínimos y máximos fueron <20- 674 quistes/ 100l. En los balnearios pertenecientes a la laguna Setúbal (n= 22) se hallaron correlaciones estadísticamente significativas entre ambos protozoarios (r = 0,597, p= 0,003), *Cryptosporidium* y turbiedad (r = 0,541, p= 0,011) y *Giardia* con *Pseudomonas aeruginosa* (r = 0,572, p= 0,005) En el 3° punto de muestreo (n= 10) también se hallaron correlaciones estadísticamente significativas entre ambos parásitos (r = 0,564, p= 0,09) y entre *Cryptosporidium* y *Escherichia coli* (r = 0,679, p= 0,031) y con *Enterococcus sp* (r = 0,678, p= 0,045) Tanto uno como otro protozoarios correlacionaron con turbiedad (r = 0,693,p= 0,026 y r= 0,863, p= 0,001, respectivamente)

Conclusiones: Los estudios realizados demuestran que *Cryptosporidium* y *Giardia* fueron detectados en aguas recreacionales del litoral argentino (ciudades de Santa Fe y Santo Tomé), durante la temporada Marzo/98- Diciembre / 99. Aún cuando las correlaciones con indicadores de contaminación variaron según el agua natural analizada, el aumento de parámetros físicos y bacteriológicos representó una mayor probabilidad de que estos enteroparásitos se encuentren en altas concentraciones.

MR20. Control de protozoos y helmintos en aguas residuales utilizadas para riego. SEMENAS L.

Laboratorio de Parasitología, Universidad Nacional del
Comahue, Bariloche, Argentina.
lsemenas@crub.uncoma.edu.ar

Cát Microbiología y Parasitología. Fac. Cs. Méd. U.N.L.P.
bpezzani@atlas.med.unlp.edu.ar.

Considerando que del 100% del agua disponible en el mundo, sólo el 3% es agua dulce, la reutilización de las aguas residuales responde al concepto de «Closed Cycled Societies» que implica circulación y reutilización de sustancias para preservar los recursos disponibles. La utilización de efluentes domiciliarios es un modo de incorporar un importante producto residual en el ciclo urbano - rural sin involucrar riesgos apreciables a largo plazo e implica además, una intervención activa del hombre en el cuidado del medio ambiente. Modernamente se considera a los líquidos residuales como un nuevo producto en el mercado del agua, esto implica entonces, que no sólo su tratamiento y disposición sino su estado sanitario deben ser adecuadamente controlados estableciendo normas estandarizadas que garanticen su uso libre de riesgos. Tradicionalmente los controles se han centrado en las bacterias desconociéndose la importancia de la fauna entérica humana compuesta por protozoos y helmintos, como otra vía posible de infección al utilizar estos productos. La técnica generalizada de desinfección que prevee el uso de Cloro en distintas formas no es suficiente para la eliminación de la mayoría de los quistes de protozoos ni de los huevos de helmintos, que naturalmente tienen ciclos de vida que les confieren resistencia especial a condiciones ambientales adversas, entre ellas la exposición prolongada a radiación ultravioleta. Las enfermedades que provocan estos parásitos se caracterizan por ser cosmopolitas, de mayor incidencia pediátrica, subdiagnósticas, con ciclos directos, con autoinfección en el hombre, en la mayoría de los casos geofílicas, con contagio directo por inhalación de formas infestantes, con sobrevivencia alta y con huevos y quistes de tamaño pequeño. Las experiencias más conocidas de uso de aguas residuales en América del Sur son el Sistema de Lagunas de Miraflores en Perú y en Argentina, el Complejo Campo Espejo en Mendoza. Y en general, se aplica como normativa de control, las Directrices Sanitarias de Aguas Residuales en Agricultura y Acuicultura de la OMS (1989) y en Argentina, existen además, las Directrices Tentativas de Calidad Microbiológica para el Reuso de Aguas Residuales en Agricultura del Consejo Federal del Agua Potable (1993).

En la Argentina, son escasos los datos poblacionales y hospitalarios sobre la incidencia de estas enfermedades a nivel nacional, aún considerando la información publicada anualmente en el Boletín Epidemiológico Nacional del Ministerio de Salud de la Nación, lo que impide tener un adecuado conocimiento del perfil epidemiológico de las poblaciones. Por lo tanto, sería necesario estandarizar los controles sanitarios sobre estos productos teniendo en cuenta los tipos de uso (forestal, espacios verdes, arboledas, jardines, huertas, plantaciones frutales, etc.), el riesgo de contacto (jornalero, jardinero, agricultor, consumidor, etc.), el perfil epidemiológico de las poblaciones bajo riego y las características del medio ambiente. Normativas como las que existen en USA y países europeos podrían servir de referencia adecuándolas al marco general que brinda el Protocolo Ambiental del Mercosur (capítulos XX y XXI) definiendo además la necesidad de establecer una Normativa de Riesgo cero (como en la legislación estadounidense) o una de Riesgo Asumible (como en las legislaciones europeas).

MR20. Contaminación parasitaria en agua de red de distribución y en suelos. PEZZANI B.

Las infecciones y enfermedades intestinales de origen parasitario constituyen un importante problema de salud en la mayoría de los países latinoamericanos. Ellas representan un índice objetivo del grado de saneamiento ambiental y de las condiciones culturales, económicas y sociales de los individuos. Adquieren su máxima importancia allí donde los servicios sanitarios son deficientes y donde existe mayor ignorancia y pobreza entre la población. El sistema de provisión de agua potable de la ciudad de La Plata consiste en el tratamiento convencional de toma a través de rejillas de agua del Río de La Plata en el Establecimiento Potabilizador "Ing. Donato Gerardi" (Punta Lara). El Río de La Plata a su vez sufre una contaminación parasitaria comprobada de tipo continuo e instantánea. Una de las fuentes puntuales de contaminación del mismo es la descarga de toneladas de materia fecal cruda sin tratamiento previo proveniente del vuelco cloacal de Berisso. Teniendo en cuenta la endemicidad de las parasitosis intestinales en nuestro medio se realizó un trabajo con el fin de evaluar la importancia del agua de uso domiciliario en la transmisión de los mismos en la población bajo estudio. La metodología empleada para la toma y procesamiento de las muestras fue la de concentración por filtración recomendada por el Standard Methods for Examination of Water and Wastewater. (American Public Health Association, 1992). Se colectaron 14 muestras de agua de grifo de la red de distribución. La región del casco urbano se dividió en cuatro zonas, dos de las cuales comprendían 70 manzanas (zonas A y C) y las otras dos, 147 (zonas B y D). Cada muestra se obtuvo filtrando 1.000 litros de agua a través de un filtro cartucho de 10 pulgadas de polipropileno con 1µm de poro nominal. Una vez en el laboratorio se efectuó el procesamiento del filtro, eluyendo con Tween 80 al 0,1%. El eluyente fue recolectado en un recipiente, donde fueron separadas y desmenuzadas manualmente sus fibras para su posterior agitación mecánica. El eluido fue centrifugado y los pellets obtenidos de cada muestra fueron recogidos en tubos de centrifuga de 50 ml, lavados con agua destilada estéril hasta la obtención de un pellet único. Cada pellet fue procesado por el método de enriquecimiento por sedimentación (Telemann modificado) para su posterior observación microscópica. La búsqueda de los parásitos se realizó mediante exámenes microscópicos en fresco y en extendidos coloreados (Kinyoun).

En las cuatro zonas muestreadas del casco urbano se hallaron parásitos mientras que en las muestras provenientes de la zona aledaña a la Planta todas las observaciones fueron negativas. El número medio por litro de todos los parásitos hallados en la zona A fue 0,29, mientras que la cifra para la zona B fue levemente inferior, 0,20. Las zonas C y D dieron cifras más elevadas respecto a las dos anteriores, 0,42 y 0,70 respectivamente. Todas las diferencias fueron estadísticamente significativas salvo entre las zonas A y B ($P = 0,063$). El número medio por litro de todos los parásitos en las cuatro zonas muestreadas fue de 0,38. Los parásitos hallados con mayor frecuencia fueron *Cryptosporidium* sp., *Blastocystis hominis*, *Entamoeba coli* y *Entamoeba hartmani*. Constatadas la presencia de los parásitos sería necesario realizar de rutina el control del sistema de distribución del agua de consumo y las obras de infraestructura necesarias tendientes a asegurar la calidad del agua provista por la Planta Potabilizadora.

Teniendo en cuenta el grado de contaminación parasitaria de las aguas estudiadas, se evaluaron parasitológica-

mente otro tipo de muestras ambientales. Se recolectaron muestras de suelos de un barrio suburbano de la ciudad de La Plata. En las mismas se hallaron larvas de nematodos, huevos de uncinarias y *Taenias sp.* y quistes de *Entamoeba coli* y *Chilomastix mesnili*. Se realizó también el análisis de

tierras de las 23 plazas de la ciudad de La Plata. Las formas más frecuentemente encontradas fueron: larvas de nematodos, huevos de *Ascaris*, huevos de *Toxocara sp.*, quistes de *Giardia sp.*, quistes de *E. coli* y huevos de *Trichuris sp.*

COMUNICACIONES

VE: VECTORES

VE1. Primer registro de dípteros productores de miasis en Bahía Blanca OLIVA A, GARCÍA S, VISCIARELLI E, COSTAMAGNA SR, LUCCHI L, ORIANI S, GONZÁLEZ L, PIZZORNO M.

Cátedra de Parasitología Clínica, Departamento de Biología Bioquímica y Farmacia. Universidad Nacional del Sur. rcostama@criba.edu.ar.

Introducción: El Orden Díptera incluye a un grupo de insectos pertenecientes al Suborden Cyclorhapha (moscas) cuyas larvas invaden tejidos vivos de humanos o animales produciendo una enfermedad parasitaria llamada miasis. En Bahía Blanca, hasta el momento, no hay literatura reportada sobre clasificación taxonómica de dípteros cicloforos causantes de miasis humanas. En el presente trabajo se determinó género y especie de moscas cuyas larvas fueron causantes de dos casos clínicos de miasis en Bahía Blanca.

Materiales y Métodos: En el caso 1 las larvas fueron extraídas por incisión de una herida abdominal que había estado expuesta al aire libre mientras el paciente dormía. En el caso 2 se extrajeron larvas de una lesión de un dedo del pie de un paciente diabético. En ambos casos el material fue remitido a nuestra cátedra y se fijó en alcohol 70° para su posterior estudio; el resto se dejó en vida para continuar su ciclo evolutivo en el laboratorio. Para la clasificación se utilizaron claves taxonómicas.

Resultados: Basándose en las características morfológicas de las larvas (aspecto exterior, espiráculos anteriores, posteriores y aparato cefalofaríngeo) y de los adultos obtenidos en el laboratorio se determinaron las especies productoras de miasis. Para el caso 1 fue *Cochliomyia hominivorax*, y para el caso 2 *Phaenicia eximia*.

Conclusión: Por primera vez se menciona a *Phaenicia eximia* como causante de miasis humana en Bahía Blanca y posiblemente en la República Argentina.

En virtud de que la Cátedra de Parasitología Clínica de la Universidad Nacional del Sur integra la Red Nacional de Investigación y Vigilancia en Vectores y Reservorios (RIVVR) sería de interés recibir en nuestro laboratorio muestras obtenidas de lesiones compatibles con miasis, a fin de continuar con las investigaciones en entomología sanitaria en Bahía Blanca

VE2. Influencia de factores climáticos en poblaciones inmaduras de *Anopheles albicans* en ecotopos naturales de la Ciudad de Salta. Estudio preliminar. MENDEZ MC, GORUSTOVICH MNA, SEGURA MA, DURAN C.

Fac. de Cs. Naturales, Universidad Nacional de Salta. Subsidiado por C.I.U.N.Sa. mendezmc@unsa.edu.ar

Es de interés la influencia de los factores ecológicos sobre la bionomía de poblaciones de culicidos. El objetivo del

presente trabajo fue correlacionar factores climáticos con la población de culicidos detectados en aguas de un arroyo urbano de la Ciudad de Salta. Se realizaron cada 7 días colectas de formas inmaduras de *An. albicans* empleando la metodología descrita por Belkin et al. (1965). Se seleccionaron al azar 5 estaciones de muestreo a lo largo del arroyo "El Huaico" ubicado a 5 km del centro de la ciudad, en cuyo margen noroeste se encuentra una urbanización. El período de estudio fue de enero a junio de los años 1999 y 2000. Se realizaron 48 colectas. Se obtuvieron 2058 larvas de anofelinos en diferentes estadios, emergiendo el 7 % como adultos, que fueron determinados como *An. albicans* (N). El número de larvas colectadas se correlacionó con factores climáticos como t° media mensual, promedio mensual de precipitaciones y días con heladas. Se observó que el mayor porcentaje de larvas colectadas (51 %) correspondió a una t° media mensual de 25 °C, 90 mm de precipitación y días sin heladas.

VE3. Aplicación de temephos (Abate) como método de control de criaderos de *Aedes aegypti* dentro del cementerio Británico de la Ciudad de Buenos Aires. VEZZANI D, VELAZQUEZ SM, SOTO S y SCHWEIGMANN N.

Grupo de Estudio de Mosquitos. F.C.E.yN., U.B.A., Buenos Aires, Argentina. tato@ba.net

Los cementerios son ambientes urbanos favorables para la proliferación de *Aedes aegypti*, vector de la fiebre amarilla y el dengue. El objetivo del presente trabajo es evaluar el efecto del larvicida Abate sobre los criaderos de *Ae. aegypti* en el cementerio Británico de la Ciudad de Buenos Aires. Se realizó un monitoreo semanal de criaderos durante dos temporadas consecutivas: octubre98-mayo99 (sin aplicación de Abate) y oct99-mayo2000 (con aplicación de Abate). El larvicida fue colocado en todos los recipientes presentes al inicio y a mediados de la segunda temporada.

En la tabla se resumen los niveles de infestación registrados antes y después de la aplicación del método de control.

	Previo al control	Posterior al control
Infestación total	15,7% (939/5972)	2% (70/3551)
Infest. máxima mensual	43,7% (340/778)	10,3% (24/234)

Los niveles de infestación totales y los máximos mensuales fueron significativamente superiores ($p < 0,01$) antes de aplicarse Abate. El tiempo de reinfestación de *Ae. aegypti* luego de aplicarse la medida de control varió desde 3 meses al inicio de la temporada (niveles bajos de infestación) hasta 1 mes en el momento más favorable para el vector (febrero-marzo). La utilización de Abate como método de control de *Ae. aegypti* resultó ser efectiva para reducir los

niveles de infestación del vector en el cementerio Británico. Sin embargo, dichos valores en los meses de febrero y abril fueron muy superiores a los valores umbrales recomendados por la O.P.S. (1-2%). Nuestros resultados sugieren que para reducir los niveles de infestación por debajo de los niveles umbrales de riesgo de transmisión de dengue, debería aplicarse Abate con una periodicidad menor a un mes.

VE4. Niveles de infestación domiciliaria por *Aedes aegypti* (L) en la Ciudad de Salta. GORUSTOVICH MNA, RAMIREZ G, MENDEZ C, OTERO MC, SEGURA MA, SEGOVIA A.

Fac. de Cs. Naturales, Universidad Nacional de Salta. Subsidiado por el C.I.U.N.Sa. gorustov@ciunsa.edu.ar

Es de creciente interés el estudio de la distribución de *Aedes aegypti* por su importancia como vector de virus responsables de dengue y fiebre amarilla.

El objetivo del presente trabajo fue determinar los niveles de infestación domiciliaria por estados inmaduros de *Aedes aegypti* (L) en urbanizaciones de la Ciudad de Salta.

Siguiendo la metodología descrita por Belkin et al. (1965), se realizó un relevamiento en 3 barrios de la Ciudad de Salta entre los días 8 y 10 de mayo de 2000, obteniéndose muestras de agua contenida en recipientes hallados en 30 viviendas de 9 manzanas seleccionadas al azar; así mismo como de un canal de desagües pluviales. Las formas inmaduras recogidas fueron trasladadas al laboratorio con agua de criadero para su posterior identificación. Los indicadores entomológicos utilizados fueron: Índice de viviendas (IV) (OPS P.C.N° 548, 1995), e Índice de densidad (ID) (OMS). Las 6 muestras extraídas del canal fueron negativas, registrándose la presencia de otros dípteros, como larvas de quironómidos, y larvas y pupas de ceratopogónidos. El 43 % de las viviendas relevadas fueron positivas para *Aedes aegypti* (IV=43%). La comparación entre los resultados del Índice de viviendas (IV) con la conversión al Índice de Densidad (ID) muestra que la situación entomológica se encuentra en ID=6. Los recipientes donde se hallaron formas inmaduras estuvieron representados por: vasos plásticos de 250 ml con plantas en agua (51%), neumáticos (23%), macetas (6%) y frascos de vidrio (2%).

Aunque el tamaño de la muestra estudiada no es representativo de la población, los resultados obtenidos en el presente trabajo sugieren un elevado índice de infestación domiciliaria por *Aedes aegypti* en la Ciudad de Salta.

VE5. Estudios electroforéticos y bioquímicos sobre glicerol-3-fosfato deshidrogenasa de *Triatoma infestans*. SCARAFFIA PY, GEREZ DE BURGOS NM.

Cátedra de Química Biológica. Facultad de Ciencias Médicas (Universidad Nacional de Córdoba). Córdoba, Argentina. pscaraffia@biomed.uncor.edu

La enzima glicerol-3-fosfato deshidrogenasa citosólica (GPDH) desempeña un papel central en el metabolismo de músculos relacionados con el vuelo en insectos. Esta enzima integra el sistema lanzadera que transfiere hidrógenos desde el citosol a la mitocondria. En trabajos previos hemos demostrado que GPDH de músculos torácicos de *T. infestans* adultos presenta niveles de actividad específica significativamente más altos que los de ninfas de V estadio. En esta comunicación se presentan estudios adicionales de esta enzima: electroforesis vertical en geles de almidón de extractos de músculos torácicos de ninfas de V estadio y adultos de *T. infestans* y propiedades cinéticas de la enzi-

ma de músculo adulto. Los patrones electroforéticos mostraron la existencia de una sola fracción en músculos de ninfas y de adultos, pero la enzima de músculo adulto posee mayor movilidad que la de ninfas. Es posible que este hallazgo indique la existencia de dos isozimas diferentes que se expresan en distintas etapas del desarrollo. La GPDH del estado adulto es inhibida por sustrato (DHAP) a partir de 0.3 mM. Esta inhibición es dependiente del pH y de la temperatura. Los menores valores de eficiencia catalítica (V_{max}/K_m), V_{max} y porcentajes de inhibición, se obtienen a pH 7.4. En el rango de pH estudiado (6.1 a 7.4), la afinidad de la enzima por DHAP no se modifica. Los valores de V_{max} y V_{max}/K_m aumentan a medida que la temperatura asciende de 20 a 37°C. La menor K_m se obtiene a 20°C. La inhibición por altos niveles de DHAP es menor a 37°C. A temperaturas superiores a 30°C, el efecto de la temperatura sobre GPDH, permitiría incrementar la operación del sistema conmutador del glicerofosfato y asegurar el suministro de ATP durante la actividad de vuelo. Esto sugiere la existencia de un efecto regulador de la temperatura sobre la actividad GPDH.

VE6. Uso de corrales experimentales para estudiar la dinámica poblacional de *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae) bajo condiciones naturales. VAZQUEZ PROKOPEC GM, CEBALLOS LA, STARIOLO R, CANALE DM, GÜRTLER RE

Depto. de Ciencias Biológicas, FCEN, UBA, Buenos Aires; Servicio Nacional de Chagas, Córdoba, Argentina. gurtler@bg.fcen.uba.ar.

En el norte de la Argentina *Triatoma infestans* puede alcanzar altas densidades en los corrales de cabras, y estos focos residuales reinfestan el domicilio luego de la aplicación de insecticidas. Para estudiar la dinámica poblacional de *T. infestans* se han utilizado ranchos experimentales que imitan a las estructuras domiciliarias, pero éstas presentan condiciones muy diferentes a las de un corral. En este trabajo se estudió la dinámica poblacional de *T. infestans* en corrales experimentales bajo condiciones climáticas naturales durante 6 meses. En Córdoba (Santa María de Punilla) se armaron 6 corrales de 1 m³ con troncos horizontales de algarrobo y mistol sostenidos por troncos verticales, y un techo de «jarilla» cubierto con un plástico negro y ladrillos de adobe. Cada corral se cerró con una jaula con tela de mosquitero de fibra de vidrio. Todas las noches se introdujo una gallina como fuente de alimentación. A fines de octubre de 1999 se colonizó cada rancho con 28 *T. infestans* (5 III, 5 IV, 5 V, 5 M, 8 H), y se los censó en enero, febrero y abril de 2000 utilizando tetrametrina 0,2% para extraer a los triatominos de los troncos. Durante febrero y marzo se registró un muy leve amortiguamiento de la temperatura máxima diaria del techo del corral respecto al exterior. Las seis poblaciones se establecieron (31-140 *T. infestans* en enero, 45-254 en Febrero). En abril solo un corral presentó 264 triatominos, mientras que el resto se mantuvo en 10-128 *T. infestans*, probablemente debido a excesivas lluvias y al posterior descenso de temperatura. Predominaron las ninfas I (50% en febrero) y ninfas II (25% en abril). La proporción de adultos se mantuvo constante (27-38% del total). El techo albergó una mayor cantidad de triatominos y huevos que los palos, aunque éstos presentaban una gran cantidad de agujeros naturales. La fecundidad (huevos/hembra-día) fue 0,57 (noviembre-enero), 1,07 (febrero) y 0,33 (marzo-abril). Los corrales de palos presentan condiciones más adversas para el desarrollo de *T. infestans* que los ranchos experimentales, y permiten estudiar aspectos de detección y localización del vector.

VE7. Análisis de las relaciones filogenéticas entre vectores de *Trypanosoma cruzi*. GARCÍA BA, MORIYAMA E*, POWELL J*

*Cátedra de Química Biológica, Facultad de Ciencias Médicas, UNC, Córdoba, Argentina; *Department of Ecology and Evolutionary Biology, Yale University, New Haven, USA. bgarcia@biomed.uncor.edu*

Con el propósito de estudiar las relaciones filogenéticas de insectos pertenecientes a la subfamilia Triatominae, se analizaron dieciocho especies. Once del género *Triatoma* que pertenecen al complejo *infestans* (*T. infestans*, *T. guasayana*, *T. sordida*, *T. platensis*, *T. brasiliensis*, *T. rubrovaria*, *T. vitticeps*, *T. delpontei*, *T. maculata*, *T. patagonica* y *T. matogrossensis*) y cuatro miembros del mismo género pero de diferentes complejos (*T. circummaculata*, *T. dimidiata*, *T. protracta* y *T. mazzottii*). Como posibles extragrupos para el análisis se estudiaron *Panstrongylus megistus*, *Mepraia spinolai* y *Rhodnius prolixus*. Se secuenciaron fragmentos de ADN mitocondrial de los genes ribosomales 12S y 16S (342 y 509 pares de bases, respectivamente) de cada una de las 18 especies mencionadas y del gen Citocromo Oxidasa I (COI) (1.447 pares de bases) para 9 de esas especies.

La reconstrucción filogenética se realizó mediante el método de máxima parsimonia (Swofford, 1999) y de «neighbor-joining» (Saitou & Nei, 1987). Las secuencias de los tres genes se analizaron individualmente y en forma combinada (12S+16S y 12S+16S+COI). Todos los árboles filogenéticos obtenidos revelaron una estrecha relación entre *T. infestans*, *T. platensis* y *T. delpontei*, así como entre *T. sordida* y *T. matogrossensis*. Por otra parte, del análisis de ambas combinaciones de genes, se concluye que otros agrupamientos bien definidos son los siguientes: a) *T. guasayana*, *T. rubrovaria*, *T. circummaculata* y *T. patagonica*; b) el grupo (*infestans-platensis*) *delpontei*) y las restantes especies de *Triatoma* (excepto *T. vitticeps*, *T. dimidiata*, *T. protracta* y *T. mazzottii*); c) *T. vitticeps* con las otras especies del complejo *infestans* y *T. circummaculata*; d) *T. mazzottii* y *T. dimidiata*. *T. mazzottii* pertenece al complejo *phyllosoma* y *T. dimidiata* fue ubicado en el mismo complejo con incertidumbre acerca de sus afinidades morfológicas con los miembros de ese complejo. La estrecha relación observada entre estas dos especies confirma que pertenecen al mismo grupo.

VE8. Efecto de la alimentación de *Triatoma infestans* sobre aves en la infección por *Trypanosoma cruzi*. FLORES BONIFAZ NL, SEGURA MA, DIOSQUE P, PADILLA AM Y BASOMBRÍO MA.

Fisiología Animal, Fac. Cs. Naturales, Laboratorio de Patología Experimental, Fac. Cs. de la Salud. UNSa. Salta, Argentina. nlf@topmail.com.ar

Las aves son hospedadores de *Triatoma infestans* no susceptibles a *Trypanosoma cruzi*. Estudios realizados en la región noroeste del país muestran que las gallinas ocupan un lugar importante en el perfil alimentario de *T. infestans*. Las vinchucas encontradas en gallineros presentan tasas de infección bajas y la presencia de gallinas en modelos experimentales reduce la transmisión del parásito al vector. El presente trabajo pretende contribuir a los estudios realizados sobre el rol de las aves en la transmisión de *T. cruzi* aportando los datos de laboratorio faltantes para responder el siguiente interrogante: ¿La sangre aviar produce una disminución en los niveles de infección por *T. cruzi* en *T. infestans*?. Se infectaron vinchucas con *T. cruzi* y se

distribuyeron aleatoriamente en tres grupos: A) alimentadas sobre gallina, B) alimentadas sobre cobayo y C) sin alimentar. Las alimentaciones se realizaron a los días 45 y 60 post infección. Al día 70 se realizó la lectura cuantitativa individual de las heces en cámara de Neubauer. Se encontró un alto porcentaje de lecturas negativas en vinchucas alimentadas sobre gallina (44%) en comparación con los grupos B (20%) y C (15%). El análisis estadístico del número de parásitos / μ l de heces reveló diferencias altamente significativas entre vinchucas alimentadas sobre gallina y vinchucas alimentadas sobre cobayo. Esto se demostró en un experimento hecho con alta densidad inicial de parásitos ($p < 0.0001$) y otro con baja densidad inicial ($p = 0.0102$). Los grupos A y C presentaron diferencias únicamente en el experimento con baja infección inicial ($p = 0.0091$). Este trabajo muestra que la alimentación sobre hospedadores no susceptibles (gallinas), ocasiona una disminución en la carga parasitaria de vinchucas infectadas con *T. cruzi*, comparada con alimentaciones sobre hospedadores susceptibles a *T. cruzi*.

Este trabajo fue subsidiado por CIUNSA y CONICET.

VE9. Long-term effects of housing improvement prior to deltamethrin spraying on reinfestation by *Triatoma infestans* in rural north-western Argentina. CECERE MC, GÜRTLER RE, CANALE DM*, CHUIT R**.

*Depto Cs Biológicas. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, UBA, Buenos Aires; *Servicio Nacional de Chagas, Córdoba; **Academia Nacional de Medicina de Buenos Aires, Buenos Aires. Argentina. carla@bg.fcen.uba.ar.*

Triatoma infestans is the main vector of *Trypanosoma cruzi*. The long-term effects on domiciliary reinfestation by *T. infestans* of a combined program of housing improvement and a single insecticide application at Amamá (50 houses; Santiago del Estero) relative to a single insecticide application in the neighboring villages of Trinidad-Mercedes were evaluated from 1992 to 1997 (41 houses). At Amamá, 60% (30/50) of the houses with unplastered or cracked indoor walls were re-plastered with mixtures of soil, cement and other materials by masons and householders; and 55% (11/20) of the houses were already well plastered. All domestic and peridomestic areas were sprayed with deltamethrin (K-Othrina, Agrevo) at ~ 25 mg/m² by professional sprayers. Domiciliary and peridomestic infestations were evaluated by the flushing-out method, domiciliary biosensor boxes, and householders' collections every 6 months. Demographic and environmental attributes of each household were recorded through questionnaires and direct inspection. *T. infestans* colonies were selectively sprayed with deltamethrin. During 1993-1995, Amamá (combined program) experienced a significantly lower likelihood of domiciliary reinfestation than the villages that had only been sprayed with deltamethrin. Peridomestic sites housing domestic animals were the first to become reinfested, and reached more abundant triatomine populations than domiciliary areas. In a multiple logistic regression analysis, the only significant predictors of the likelihood of domiciliary reinfestation were the occurrence of an infested peridomestic site in the house (in 1993-1995), and the capture of 10 or more *T. infestans* in domiciliary areas before the 1992 insecticidal spray (in 1996). Triatomine control or elimination programs would benefit from combining insecticidal sprays and environmental management measures aimed at reducing the availability of domestic and peridomestic refuges for *T. infestans*. This study was supported by

grants from the Rockefeller Foundation and from Universidad de Buenos Aires.

VE10. Ensayo de una ovitrampa para *Triatoma infestans* en corrales experimentales bajo condiciones naturales. CEBALLOS LA, VAZQUEZ PROKOPEC GM, STARIOLO R, CANALE DM, GÜRTLER RE.

Depto. de Ciencias Biológicas, FCEN-UBA, Buenos Aires; Servicio Nacional de Chagas, Córdoba, Argentina. gurtler@bg.fcen.uba.ar

Se desarrolló y probó un prototipo de ovitrampa para la detección de *Triatoma infestans* en 6 corrales experimentales bajo condiciones naturales en Punilla, Córdoba, durante 6 meses. Los corrales de palos y los procedimientos generales son los descriptos por Vazquez Prokopec et al. en esta misma reunión. El prototipo consistió en una caja de plástico (5 x 9 x 16 cm) con aberturas en la cara superior y cuero en su interior. El mismo se ubicó debajo del techo de «jarilla» de 80 x 80 cm con sus aberturas en contacto con el techo. En octubre de 1999 se colonizó cada corral con 28 *T. infestans* (5 ninfas III, 5 IV, 5 V, 5 M, y 8 H). Los corrales y los prototipos se revisaron en diciembre de 1999 y enero, febrero y abril del 2000. Luego de registrar el número y localización de cada signo de infestación los insectos y los huevos no eclosionados fueron devueltos a sus respectivos corrales. El número medio de hembras por corral (13-18 hembras) varió ligeramente entre meses. Los huevos fueron el signo de infestación más abundante dentro de las ovitrampas en todas las inspecciones. El porcentaje de huevos dentro del prototipo respecto al total colectado en cada corral varió del 12% (SD=4,8) en enero al 10% (SD=2,9) en febrero. Para evaluar si las hembras oviponían directamente dentro de las ovitrampas se colocó, en febrero del 2000, un cartón entre la misma y el techo del corral, impidiendo así que cayeran huevos desde el techo. En abril el 5% (SD=4,5) del total de los huevos fueron colocados activamente por las hembras en las ovitrampas. El 100% de los prototipos detectaron al menos 1 huevo en diciembre, enero y febrero, y el 50% en abril. Las deyecciones fueron más frecuentes en el interior de las ovitrampas que los propios triatomíneos y sus exuvias. Este sencillo prototipo, en una localización específica determinada en estudios previos, provee condiciones adecuadas como sitio de oviposición para *T. infestans*, y permitiría monitorear la reinfestación peridomiciliar de los corrales mediante un signo específico durante la temporada cálida.

VE11. Caracterización y metabolismo de fuentes de carbono en hongos patógenos a *Triatoma infestans*. CALDERÓN FERNANDEZ G¹, CRESPO R¹, JUÁREZ MP¹, LECUONA R² y CAFFERATA LFR³.

¹Inst. Investig. Bioquím. La Plata, Fac. Cs. Méd, UNLP, calles 60 y 120, La Plata. ²IMYZA-CICA-INTA, Castelar, Castelar, Bs As. ³Lab. Quím. Org., Ladecor, Fac. Cs Exactas, UNLP, calles 47 y 115, La Plata. mjuarez@isis.unlp.edu.ar

Se reporta la detección de cepas de *Beauveria bassiana* patógenas a *Triatoma infestans*, principal insecto vector de la enfermedad de Chagas en Argentina. Estas cepas producen un 100% de mortalidad, con un tiempo letal medio que varían de 7.7 a 11.1 días. La infección fúngica se inicia previa adhesión y penetración a través de la cutícula del insecto hospedador. La degradación de los hidrocarburos cuticulares de insecto, es una ruta metabólica importante para la producción de energía (Napolitano R. and M. P. Juárez.

1997. *Arch. Biochem. Biophys.* 344: 208-214). Se analizó el efecto de períodos de inducción en un medio de cultivo conteniendo hidrocarburos como única fuente de carbono (Medio-HC), sobre el perfil lipídico, la composición de ácidos grasos e hidrocarburos fúngicos. Cultivos de *B. bassiana* inducidos a crecer en agar enriquecido con hidrocarburos, como única fuente de carbono lograron reducir el tiempo de mortalidad de *T. infestans* en un 20%. Los esteroides predominan en las células crecidas en condiciones control, en un medio rico en glucosa (Medio-GL), en tanto que el crecimiento en medio-HC produce grandes cantidades de triacilglicérols. La relación ácido graso insaturado/saturado disminuye en cepas crecidas en medio-HC; además, se modifica notablemente la composición de la fracción saturada, detectándose la presencia mayoritaria del ácido heptadecanoico acompañado de eicosanoico, mientras que en la fracción insaturada, se destaca el ácido heptadecenoico. El análisis por espectrometría de masa de los hidrocarburos de *B. bassiana* mostró una distribución de cadenas lineales mayoritariamente saturadas, de 18 a 37 átomos de carbono. En células crecidas en hidrocarburo, se detectan cantidades similares de cadenas pares e impares. Cultivos en medio-GL incorporan 19% de [¹⁴C]acetato en sus lípidos, sin embargo, períodos de inducción en medio-HC reducen su utilización al 5.3%.

VE12. Action of hemolymph of *Veneza zonata* (hemiptera: coreidae) on different trypanosomatids. BACCAN GC*, FERREIRA FALLEIROS AM*, CAVAZZANA M JR*, DE OLIVEIRA D*, JANKEVICIUS JV*, ATTIAS M**, DE SOUZA W** & JANKEVICIUS SI*.

Departamento de Microbiologia, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina, 86051-900, Londrina, Paraná-BrazilInstituto de Biofísica, Centro de Ciências da Saúde, Bloco G, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Cidade Universitária, 21949-900, Rio de Janeiro-Brazil jankevic@sercomtel.com.br*

The insect *Veneza zonata* is a hemipteran of the family Coreidae, an important vector for trypanosomatids. Its geographic distribution is wide, ranging from the U.S. to South America. These insects feed on corn, sorghum, bean, soy, tomato, guandu and various other leguminosae and fruits. The humoral response of *Veneza zonata* against 3 different trypanosomatids: 1) strain 714TD, a *Leptomonas* isolated from the digestive tract of *V. zonata* which infects the salivary glands of these insects as well as plants (Cavazzana, 1999); 2) *Leishmania (L) amazonensis*, representing trypanosomatids that cannot infect *V. zonata*, and 3) strain 563TD, a *Leptomonas* isolated from the digestive tract of *Euchistus heros* (Hemiptera: Pentatomidae), was evaluated. Hemolymph of *V. zonata* agglutinated only *L. (L) amazonensis* and hemocytic recognition was more intense with this strain. *L. (L) amazonensis* activated the prophenoloxidase system, whereas strains 714TD and 563TD did not activate this system but rather seemed to inhibit phenoloxidase activity. Strain 563TD was highly pathogenic for *V. zonata*, provoking its death within a short period of time, probably due to septicemia.

Supported by CNPq/CPG-UEL

VE13. Aislamiento de Nuevas Cepas Entomopatogénicas de *Bacillus sphaericus*. LANATI L, CUCCHI A.

Dpto. de Química Biológica, Fac. de Ciencias Exactas y Naturales (UBA), Buenos Aires, Argentina. adri@qb.fcen.uba.ar.

Bacillus sphaericus (Bs) es una bacteria entomopatógena que durante el proceso de esporulación produce junto a sus esporas inclusiones proteicas con actividad insecticida. Esta característica la convierte en una herramienta de gran interés para el control biológico de ciertos insectos como los mosquitos, vectores de diversas enfermedades como filariasis y encefalitis, que afectan al hombre y al ganado. La actividad insecticida de los cristales de (Bs) es utilizada para controlar a los mosquitos por la marcada sensibilidad de sus estadios larvales a la toxina. En particular las especies más afectadas son culícidos del género *Culex* sp., que suelen habitar ambientes tanto naturales como urbanos.

Con el objetivo de aislar nuevas cepas de Bs que presenten ventajas como una mayor toxicidad y rango de huéspedes con respecto a las cepas conocidas, se realizaron aislamientos a partir de muestras de diferentes ambientes.

Con los nuevos aislamientos de Bs se efectuaron ensayos biológicos para evaluar la actividad insecticida sobre larvas de *Culex* sp. de estadios III y IV. También se analizaron las proteínas del cristal por SDS-PAGE, indentificándose las bandas de 51 y 42 kDa \cong responsables de la actividad insecticida. Con los clones de interés se realizaron ensayos de supervivencia en agua proveniente de ambientes naturales, evaluándose la viabilidad de las esporas a diferentes temperaturas.

Entre los clones analizados, hemos obtenido tres (V2, A31, C7) que presentan una toxicidad similar o mayor que las cepas de Bs control empleadas (1593 y 2362) frente a larvas de *Culex* sp. Asimismo, los ensayos de supervivencia han mostrado que dichas cepas presentan una viabilidad similar o mejor que las cepas control.

VE14. Estudios de supervivencia en *Bacillus thuringiensis*. CUCCHI A.

Dpto de Qca. Biológica, Fac. de Cs. Exactas y Naturales (UBA), Buenos Aires, Argentina. adri@qb.fcen.uba.ar.

Bacillus thuringiensis (BT) es uno de los principales biopesticidas utilizado en el control de vectores de enfermedades y plagas de cultivos. *B. thuringiensis israelensis* (BTI) es muy activo sobre distintas especies de *Aedes*, vectores de enfermedades como dengue, fiebre amarilla y filariasis. Por otro lado *B. thuringiensis kurstaki* (BTK) es empleado para controlar lepidópteros y coleópteros que atacan cultivos y granos almacenados. Las ventajas del uso de BT en estrategias de control biológico incluyen una alta especificidad y gran seguridad por no ser tóxicos. Sin embargo, uno de los problemas que enfrenta el uso de estas bacterias involucra su baja supervivencia en el ambiente.

Es por ello que se ha caracterizado la respuesta a distintos agentes, usados como indicadores de viabilidad. Se ha analizado la supervivencia a calor, sal (ClNa), H₂O₂ (estrés oxidativo), solventes (octanol) y lisozima en esporas de BTI y BTK.

Estas respuestas han sido comparadas entre cepas tóxicas (que producen cristal o Cry⁺) y cepas no tóxicas (Cry⁻), para evaluar la incidencia de la síntesis del cristal sobre tales propiedades de las esporas.

Todas las respuestas analizadas en BT han resultado menores a la observada en *B. subtilis*, bacilo tomado como patrón.

Asimismo, la respuesta a sal, solvente, H₂O₂ y lisozima ha sido inferior en las cepas tóxicas Cry⁺ que en las no tóxicas Cry⁻. Estos resultados se pueden explicar en base al costo energético que implica la síntesis del cristal durante el

proceso de esporulación (un 30% del peso seco de la espora corresponde al cristal), formándose esporas menos resistentes cuando ocurre la síntesis concomitante del cristal.

VE15. Control de la Enfermedad de Chagas en Venezuela FELICIANGLI MD^{1,2}, MARTINEZ C³, ZERPA M⁴, MATOS A³, GONZALEZ D³.

¹Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad de Carabobo, Núcleo Aragua, Maracay, Venezuela; ²Escuela de Malariología y Saneamiento Ambiental "Dr. Arnoldo Gabaldon" (MSDS). Maracay, Venezuela; ³Dirección General de Salud Ambiental y Contraloría Sanitaria, Dirección de Vigilancia Epidemiológica Sanitaria Ambiental; ⁴Corposalud Aragua, Maracay, Venezuela.

Las primeras acciones para el control de la Enfermedad de Chagas en Venezuela iniciaron en 1958. El Programa se estableció oficialmente a partir del año 1966. El objetivo ha sido interrumpir la transmisión intradoméstica a través del control de los vectores, con el apoyo del Programa Nacional de Vivienda Rural y el Programa de Mejoramiento Integral de la Vivienda Campesina. Los logros obtenidos son evidentes a través de las cifras de seroprevalencia registrados en las cuatro décadas del Programa: 44,5% (1958-1968), 15,6% (1969-1979), 13,7% (1980-1989) y 8,1% (1990-1999). En los menores de 10 años los datos correspondientes son: 20,5%, 3,9%, 1,1% y 0,8% respectivamente. Sin embargo, cuando se analizan los datos obtenidos durante los últimos 8 años, a partir de 1996 se observa un aumento significativo de la seroprevalencia en este grupo de edades. Los datos entomológicos también muestran un aumento en los valores de los índices de infestación a lugares y casas para *Rhodnius prolixus* y de los índices de infección de lugares y casas a *Trypanosoma cruzi*. Una nueva estrategia, basada en la descentralización y la integración de los Servicios de Salud, la cual contempla una re-orientación del Programa a la Atención, Prevención y Control de la Enfermedad de Chagas, está actualment en fase de preparación.

VE16. Cantidad y viabilidad de huevos de *Schistosoma mansoni* obtenidos de hígado, intestino delgado e intestino grueso de ratones albinos. GRASSI L, TORRES JORDA M, GONZALEZ CAPPA SM.

Dto. de Microbiología, Fac. de Medicina, Universidad de Buenos Aires, Argentina.

El ciclo de vida de *S. mansoni* incluye a un mamífero como hospedero definitivo y a un caracol como hospedero intermediario. En el laboratorio se utilizan cercarias emitidas por caracoles para infectar ratones. Los ratones infectados proveen de huevos que liberan miracidios, que se utilizan para infectar los caracoles y completar el ciclo. Clásicamente, los miracidios se obtienen a partir de huevos acumulados en el hígado (H) de los ratones. Sin embargo, Dresden y Payne (1981) encontraron ventajas en el empleo del intestino delgado (ID). Hemos comprobado que también el intestino grueso (IG) es una fuente rica en huevos. El objetivo de este trabajo fue comparar el rendimiento de los tres órganos en cuanto al número de huevos obtenidos, su porcentaje de eclosión y la infectividad de los miracidios. Ocho ratones CF1 se infectaron con 200 cercarias de *S. mansoni*, cepas EC y SJ. Cuatro ratones se sacrificaron a los 4 meses post-infección (PI) y el resto a las 9 semanas PI. Las vísceras se homogeneizaron y tamizaron. Los huevos (retenidos en el último tamiz) se suspendieron en solución salina, y se tomaron alícuotas para estimar la cantidad de hue-

vos por órgano y su porcentaje de eclosión. Independientemente de la cepa de *S. mansoni* usada, los ratones de 9 semanas PI produjeron mayor número de huevos que los de 4 meses PI (153210 ± 86921, 27328 ± 9866). La distribución de huevos, en porcentaje, fue: ID, 65,62 ± 10,72 ; IG, 20,11 ± 5,29 ; H, 14,27 ± 5,43. Los porcentajes de eclosión fueron, en función del órgano de origen: H, 72 ± 3,4 ; ID, 31 ±

6,6 ; IG, 55 ± 7,0. Considerando el número de huevos y el porcentaje de eclosión, el ID produjo aproximadamente el doble de miracidios que los otros órganos. Para determinar la infectividad de los miracidios se expusieron caracoles individualmente a 10 miracidios. Estos caracoles serán sacrificados 14 días PI para contar los esporoquistes madres, provenientes de los miracidios exitosos.

EP: EPIDEMIOLOGÍA

EP17. *Entamoeba gingivalis* y *Trichomonas tenax* en pacientes con prótesis dental. VASCONI MD, PONCE DE LEÓN P, ZDERO M, NOCITO I, LUCCA A, PEREZ B.

Area Parasitología. Departamento de Microbiología, Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas.UNR. Rosario, Argentina. zdero@cidoc-unr.com.ar.

Entamoeba gingivalis y *Trichomonas tenax* son protozoarios de la boca del hombre, viven en el sarro dentario, en las células de la mucosa necrótica y en las márgenes gingivales de las encías. El objetivo del trabajo fue determinar en pacientes con prótesis dental: la frecuencia de estos dos parásitos orales y la relación con Ig A y el pH salival. Se seleccionaron pacientes con prótesis fija ó móvil, de cada uno se obtuvo una muestra de sarro ó placa dental de los 4 dientes incisivos inferiores y también una muestra de saliva. Ambas fueron recogidas por la mañana sin cepillado previo ó luego de transcurrido un tiempo no menor a tres ó cuatro horas de la última higiene bucal. El sarro se obtuvo por raspado con uña morse estéril del material acumulado en las raíces de los dientes. Se diluyó con solución fisiológica estéril y se observó en microscopio óptico (100x y 400x aumentos). En saliva se realizó una primera observación microscópica directa y una post centrifugación (2000 rpm) a 100x y 400x aumentos para detectar estos protozoarios. De los 50 pacientes examinados, 36 (72%) presentaron parásitos, 29 estuvieron monoparasitados, 26 con *E. gingivalis* y 3 con *T. tenax*, ; los 7 restantes presentaron ambos protozoos. La frecuencia de *E. gingivalis* en la población estudiada fue 66% y 20% para *T. tenax*, predominando ambos en placa y/o sarro dental. 26 pacientes presentaron valor normal de IgA secretoria(20-40 mg/dl), 6 superiores y 2 inferiores al mismo. Los rangos de pH salival en los pacientes fueron: 2 individuos con pH 5 - 5,5; 11 con pH 6 - 6,5; 17 con pH 7 - 7,5; 4 con pH 8 - 8,5 y 2 con pH 9 - 9,5 (pH normal 6-7,5). Se concluye: 1- alta frecuencia de parásitos bucales en pacientes con prótesis dental, siendo mayor la de *E. gingivalis* con respecto a la de *T. tenax*. 2- la aplicación del test de χ^2 no evidencia asociación entre presencia de parásitos bucales con IgA y pH salival.

EP18. Prevalencia de *Trichomonas vaginalis* en Hospital Zonal y área de influencia. CANOVA GM.

Hospital Zonal de Merlo. Merlo. San Luis. Argentina. Serceba@infovia.com

Se analizaron 878 muestras de orina y 93 exudados vaginales en mujeres adultas sexualmente activas. Se solicitó en todos los casos la orina correspondiente a la primera de la mañana. Se extrajo con espéculo, material del fondo de saco vaginal utilizando hisopo de algodón en solución fisiológica. En ambos casos se realizó la búsqueda de *T.*

vaginalis en el sedimento, obteniéndose los siguientes resultados:

Total de Mtras. de Orina	Total de Mtras de Orina con presencia de <i>T. vaginalis</i>	Total de ex. Vag.	Total de ex. Vag. con presencia de <i>T. vaginalis</i>
878 (100 %)	26 (2,73 %)	93 (100 %)	16 (17,20 %)

Se observó una relación directa entre la presencia del trofozoito y piuria: 92,31 % en orinas y 100 % en exudados vaginales (Más de 10 leucocitos / campo microscópico).

La mayor tasa de prevalencia observada en muestras de fórnix posterior se debe a que en todos los casos estudiados, las pacientes manifestaron sintomatología en la consulta ginecológica (leucorrea, prurito vulvar, disuria); en tanto que las orinas corresponden a análisis de rutina.

Los hallazgos encontrados deben ser considerados, aunque se encuentren distantes del 40% promedio informado en países subdesarrollados, siendo la higiene deficiente y la promiscuidad las principales causas de esta parasitosis.

EP19. Prevalencia de la Echinococcosis canina en diferentes áreas de la Pcia de Córdoba. NIETO SOSA L, SICILIANO C, ASIS R, BARNES A.

IIº Cat de Parasitología Fac. Cs Ms. UNC. Htal Rawson, Córdoba, Argentina; Dpto. de Zoonosis, Minist de Salud, Córdoba, Argentina. abarnes@fcm.unc.edu.ar

Objetivos: Determinar la infección echinococcósica canina en la provincia de Córdoba.

Mat. y Métodos: Ante la consulta en nuestro servicio de pacientes con Hidatidosis, se decide realizar un trabajo de terreno para conocer y evaluar la vigencia de esta zoonosis en los perros principal eslabón de la cadena epidemiológica. Se eligieron Dptos de la Pcia según la procedencia de los pacientes .Se citó a la población con sus perros, sin discriminar pastores / mascotas, en lugares estratégicos: escuelas, plazas, predios municipales, etc. Los cánidos fueron censados con ficha epidemiológica suministrándoles B.de Arecolina 4mg/Kg.U.D. Posterior a la catarisis se recoge el material y en bandejas de fondo oscuro se observa in situ con lupa manual y confirma con microscopio, los desechos fueron quemados y enterrados.

Resultados: La tolerancia a la droga fue buena en el 100%. En 6 Dptos.(Río Seco, Calamuchita, San Javier, San Alberto, Gral Roca, Ischillin) se desparasitaron un total de 305 perros, siendo(+) 14 para *Echinococcus.g* (4,6%). Observándose, en el Dpto. Calamuchita sobre 29 perros tratados 9 (+) (31%), en el Dpto. Río Seco de 104 canes 2 fue-

ron (+) (2%) y en el Dpto San Alberto de 33, 10 fueron (+) (3 %). La presencia de otros teniados se observó en 63 perros del total.

Conclusiones: Esta investigación epidemiológica en perros evidencia la permanencia de esta parasitosis en la provincia, coincidiendo con la consulta de pacientes provenientes de esas mismas áreas, por lo que se impone la implementación de medidas de prevención.

EP20. Investigación contemporánea de esporos de microsporidios en secreciones respiratorias y heces de niños de corta edad, con y sin patologías respiratorias, de Tucumán, Argentina. VALPERGA SM, ANTONI de JOGNA PRAT S, OVEJERO de VALPERGA GJ*, RAIMONDO de RODRIGUEZ MAISANO O, ACUÑA T, NAZAR de HERRERO MC.

*Cát. Parasitología, Fac. Bioquímica, Qca. y Fcia. (UNT); Cát. Enfermedades Infecciosas y Cát. Pediatría, Fac. Medicina (UNT); Hospital del Niño Jesús, SIPROSA, Tucumán, Argentina. soler@unt.edu.ar.

En el período junio 1999-julio 2000 se realizó un estudio prospectivo dirigido a detectar contemporáneamente esporos de microsporidios en secreciones respiratorias orofaríngeas (SR) y en heces (H) de 70 niños de 1 a 24 meses de edad internados en hospital pediátrico de Tucumán, clasificados en dos grupos: I, compuesto por 35 niños, con padecimientos respiratorios infecciosos de distintas etiologías, y II, por otros 35 niños, sin patología respiratoria de ningún tipo. En los componentes de ambos grupos coexistía otra u otras patologías, entre ellas gastroenteritis. Se admite que Tucumán es un área de baja prevalencia de infecciones por HIV en niños de corta edad, por lo que se considera que la muestra estudiada fue esencialmente HIV-negativa. La detección de esporos se efectuó mediante microscopía óptica de frotis de SR y de H coloreados con los métodos de Weber modificado por Kokoskin y de Ziehl-Neelsen Acid-Fast modificado por los autores. Para otorgar positividad a las muestras de SR debieron detectarse también células del huésped invadidas por parásitos en fase evolutiva esporogónica. Además, se determinaron el estado nutricional y la condición socioeconómica cultural del grupo familiar de cada niño. En el grupo I se detectaron microsporidios en SR de 11/ 35 niños (31,4 %) , de los cuales 7/ 11 (63,6 %) mostraron contemporáneamente esporos en sus H . En el grupo II, las SR fueron positivas en 8/ 35 niños (22,9 %) de los cuales 5/ 8 (62,5 %) también fueron positivos en las H .No puede afirmarse que el hallazgo de esporos en heces, en todos los casos, correspondan a infecciones intestinales, ya que no se obtuvieron y estudiaron biopsias de ese órgano. En conclusión, la ocurrencia de microsporidios en SR fue importante en ambos grupos, sin diferencia significativa entre ellos y también la alta concomitancia con el hallazgo de esporos en las H.

EP21. Las UNCINARIAS. Problema de hombres y animales.- TARANTO NJ*, CAJAL SP*

Instituto de Investigaciones en Enfermedades Tropicales-Universidad Nacional de Salta. ntaranto@oran.unsa.edu.ar

Se trabajó en una comunidad cerrada del norte de la provincia de Salta, sobre la frontera con la República de Bolivia. Se efectuó una recolección aleatoria de muestras fecales humanas, sin dieta ni tratamiento previo. Una vez identificados los parásitos, se cultivaron los huevos de uncinarias

por el método de Harada y Mori modificado, durante 7 a 10 días. Al cabo de los mismos se procedió a la tipificación de las larvas de tercer estadio, empleando el tamaño, la forma de la parte anterior del cuerpo, la transición bulbo esofágica-intestinal, las estrías de la vaina, la relación entre la terminación de la vaina y la terminación de la cola, entre otras. De las 45 muestras que resultaron positivas para uncinarias, 13/45 (28,9%) fueron caracterizadas como *Necator americanus*, 19/45 (42,2%) como *Ancylostoma duodenale* y 13/45 (28,9%) no pudieron ser identificadas porque al momento del análisis resultaron negativas o las larvas estaban muertas. De igual forma se procedió con 22 heces de perros del peridomicilio de los encuestados, sin identificar si provenían de animales adultos o de cachorros (hecho que influye en la incidencia) arrojando el siguiente resultado: *Ancylostoma spp.* 18/22 (81,2%); *Toxocara canis* 3/22 (13,6); *Trichuris vulpis* 3/22 (13,6%); *Hymenolepis diminuta* 1/22 (4,5%); Negativos 3/22 (13,6%). Los humanos fueron tratados con Mebendazol y los animales con inyección subcutánea de Ivermectin, lográndose la cura radical en ambos casos. Se concluye que las uncinariosis constituyen un delicado problema de salud en regiones del área subtropical argentina, por las consecuencias por todos conocidas y en el caso de los cánidos porque pueden ocasionar graves infecciones de piel producidas por las larvas al reptar subcutáneamente. Estas parasitosis son transmitidas a través de los suelos poluidos por las heces en razón de las malas condiciones higiénico dietéticas y culturales de importantes grupos de habitantes de las zonas endémicas. Debe tenerse en cuenta la coexistencia de las dos especies humanas por las características peculiares de las manifestaciones clínicas de cada una de ellas.

EP22. Interacción biológica entre hongos del suelo y huevos de *Toxocara canis*. CIARMELA ML, MINVIELLE MC, BASUALDO JA.

Cátedra de Microbiología y Parasitología. Facultad de Ciencias Médicas. Universidad Nacional de La Plata. Argentina. jabasua@atlas.med.unlp.edu.ar

El objetivo del trabajo fue demostrar la actividad biológica de hongos saprófitos del suelo sobre el desarrollo y persistencia de huevos de *T.canis*. Se aislaron dos especies fúngicas de muestras de tierra de paseos públicos de la ciudad de La Plata siguiendo la técnica de secado al vacío que fueron tipificados como *Mucor plumbeus* y *Fusarium equiseti* (Instituto de Botánica Spegazzini. UNLP). Los huevos de *T.canis* se extrajeron de hembras adultas obtenidas por desparasitación de cachorros naturalmente infectados. Las especies de hongos mencionadas y los huevos (en estadio de mórula) fueron co-cultivados a temperatura ambiente en agua destilada estéril. Se utilizaron como controles los cultivos de hongos y de huevos por separado, en las mismas condiciones. Las muestras de los cultivos fueron examinadas los días 4, 7 y 14 post-siembra por microscopía óptica (100 y 450X) y por microscopía electrónica de barrido (JEOL modelo JSM-T 100). Para la observación en microscopio electrónico se utilizó la técnica de secado por punto crítico y metalizado en oro.

Resultados: Cuando se cultivaron los huevos con la especie *F.equiseti*, la interacción biológica hongos-huevos fue progresiva desde el día 4 al 14 post-siembra. El día 14 se observaron huevos alterados por la acción de apresorios. En el cocultivo *M. plumbeus*- huevos de *T. canis* no se observó ningún efecto sobre estos huevos, desarrollándose ambos sin interferencia.

Conclusión: El hongo *Fusarium equiseti* aislado de paños públicos de la ciudad de La Plata posee efecto biológico negativo sobre huevos de *Toxocara canis*, un geohelminto patógeno frecuente en nuestro medio. Este efecto no fue observado en *Mucor plumbeus*.

EP23. Estudios epidemiológicos sobre criptosporidiosis en una zona rural de corrientes, argentina.
KOSTESKI M, REA MJF, BORDA CE, ROSA R

Centro Nacional de Parasitología y Enfermedades Tropicales, Facultad de Medicina, UNNE, Corrientes, Argentina
cborda@med.unne.edu.ar

Actualmente no existen publicaciones que registren la presencia de criptosporidiosis en el noreste de la Argentina. Para conocer su prevalencia, se llevaron a cabo trabajos epidemiológicos que incluyen el estudio del *Cryptosporidium* en Costa Grande, en la zona rural del Departamento de San Luis del Palmar en la provincia de Corrientes. En este paraje vivían 389 personas que habitaban en 76 viviendas. Hasta el momento se encuestó el 16 % y a 59 personas de ambos sexos, de todos los grupos etarios. Se observó que no disponían de agua potable, abasteciéndose de agua mediante pozos excavados (75%) y por acarreo (25%) de lagunas y esteros. La mitad de los entrevistados evacuaban en el peridomicilio y los restantes utilizaban letrinas precarias. Las muestras fecales fueron examinadas según técnicas de Hoffmann, Pons y Janer, de Ritchie y mediante frotis de Ziehl-Neelsen modificada. Se hallaron ooquistes de *Cryptosporidium* sp en el 5% (o sea tres de 59) de las personas estudiadas. Estas correspondieron a varones de 11, 16 y 53 años del mismo grupo familiar. Además estaban parasitados por otros parásitos que se transmiten por vía oral como *Giardia lamblia* y por nematodos que lo hacen a través de la piel como uncinarias y *Strongyloides stercoralis*.

Integraban esa familia seis personas que criaban en forma muy precaria aves de corral y animales domésticos como vacas, caballos y ovejas.

A pesar del escaso número de personas estudiadas, se ha podido demostrar que en Costa Grande existe el nicho ecológico que favorece la existencia de las parasitosis intestinales y entre ellas criptosporidiosis determinado por primera vez en la región.

EP24. Prevalencia de *Giardia lamblia* en una población infantil de la Ciudad de Córdoba, Argentina.

ALTAMIRA MS¹, MARGARÍA KE¹, GUIGNARD SI², ARIENTI HM², LUJÁN HD³.

¹Laboratorio de Parasitología, Hospital Municipal Infantil. ²Laboratorio de Parasitología, División Laboratorio Central de la Provincia de Córdoba. ³Cátedra de Química Biológica, Facultad de Ciencias. Médicas. Universidad Nacional de Córdoba. Argentina.
hlujan@biomed.uncor.edu.

Giardia lamblia es un protozoo parásito que habita el intestino delgado de humanos y de otros mamíferos y es el agente responsable de la giardiosis, infección que se presenta con manifestaciones clínicas que varían desde la infección asintomática a la enfermedad aguda o crónica asociada con diarrea y mala absorción. A fin de conocer la prevalencia de esta parasitosis en una población infantil seleccionada de la ciudad de Córdoba, se procesaron 1504

muestras de materia fecal de pacientes menores de diez años derivados de los diferentes Dispensarios Municipales, los cuales son representativos del cinturón periférico de la ciudad. El criterio clínico de selección de los pacientes fue al azar y los resultados obtenidos indicaron que del total de niños estudiados, 194 (12,9%) estaban infectados con *G. lamblia*. No hubo diferencias significativa entre sexos, siendo las prevalencias en niños de sexo masculino y de sexo femenino de 12,5% y 13,3% respectivamente. Tampoco se registraron diferencias según la localización geográfica de los individuos, pues al dividirse a la ciudad en norte y sur, los resultados obtenidos mostraron prevalencias de 13,1% y 13,6% respectivamente. A su vez, cuando se analizó la asociación de *G. lamblia* con otros parásitos intestinales, se registró una tendencia significativa al monoparasitismo, el cual estuvo más acentuado en la población femenina (64,9% contra 35,1% asociado) que en la masculina (55,6% contra 44,4% asociado). Por otro lado, no se registró variación estacional de esta parasitosis, indicando que las condiciones epidemiológicas se mantienen propicias a la infección durante todos los meses del año, derivando por ende en un problema sanitario de muy difícil solución.

EP25. Enteroparasitosis correspondiente al área programática del Hospital Provincial "Gumersindo Sayago". TEDESCHI FA, GRAMAGLIA A, AROLA MG, SIGNE K, ARLETTAZ S., ACHLEITNER, M.

Servicio de Laboratorio. Hospital Provincial "Gumersindo Sayago". Santa Fe. Argentina. tedeschi@fbc.unl.edu.ar

Las parasitosis constituyen las infecciones más frecuentes de la población y teniendo en cuenta que en nuestro país no existe ningún programa de control y prevención de las infecciones parasitarias y que en muchos casos son independientes del nivel socio-cultural de las personas, es necesario realizar relevamientos sanitarios de los lugares donde se establecen las poblaciones a fin de tomar las medidas preventivas necesarias. En el presente informe se comunica la frecuencia de hallazgos de parásitos correspondiente a los meses: Junio de 1997 a Junio de 2000 en pacientes que concurren diariamente al Servicio de Laboratorio del Hospital Provincial "Gumersindo Sayago" padeciendo en la mayoría de los casos de una afección intestinal. Los datos corresponden a pacientes de ambos sexos, de todas las edades y nivel socioeconómico o cultural. Las muestras analizadas mediante exámenes directos, escobillados perianal y coproparasitológicos seriados, provienen de ocho centros comunitarios, consultorios, servicio de guardia e internación. Los resultados muestran que sobre un total de 3858 muestras, 1073 (27.81%), fueron positivas; de ellas 57% resultaron monoparasitadas, donde *Giardia lamblia*, es el principal protozoo que predomina (35%); *Enterobius vermicularis* es el segundo parásito (20%) y las amebas ocupan el tercer lugar (17%). La principal asociación de parásitos (poliparasitosis) fue *G. lamblia* – *E. vermicularis* (18%) y en un 3% la asociación se debió a más de dos parásitos. Conclusiones: § En la infección por *G. lamblia* se observan picos de aparición en los meses Junio y Noviembre. § *E. vermicularis* presenta un aumento significativo el mes de marzo. § Las amebas son detectadas durante todo el año, sin que se registre un mes de predominio. § La asociación de más de dos parásitos se produce en forma aislada y sin predominio de estación u año.

EP26. Relevamiento parasitológico de una población de Chorotes en la Provincia de Salta. TARANTO N, CAJAL SP, CAFFARO CE, FERNÁNDEZ MM, DE MARZI MC, FRANK FM, BRÚ AM, MINVIELLE MC, BASUALDO FARJAT JA, MALCHIODI EL.

Lab. de Enf. Trop, UNSa, IDEHU-Inmunología, FFyB, CONICET-UBA y Cát. Microbiología y Parasitología. FCsMed, UNLP. unsaor@unsa.edu.ar

Las comunidades aborígenes que habitan el periurbano de las ciudades del norte de Salta, no han sido estudiadas de manera orgánica y multidisciplinaria hasta el presente. Esta primera experiencia con los Chorotes es el inicio de un proyecto de envergadura que tiende a cubrir la mayoría de ellas y llevar soluciones a sus problemas básicos de salud. Se examinaron un total de 92 muestras de materia fecal en las cuales se buscó la presencia de elementos parasitarios. Se tomaron 148 muestras de sangre y de suero para la determinación de parámetros hematimétricos y la detección de Ac anti-parásitos, respectivamente. El examen coproparasitológico reveló que sólo el 8,1% de los hombres y el 7,3% de las mujeres estaban libres de cualquier tipo de infección parasitaria y el resto de la población presentaba entre 1 y 5 especies. En el 64,1% de los casos se observó dos o más especies de parásitos intestinales. Las infecciones más frecuentes fueron por protozoos (especialmente *Giardia intestinalis* y *Entamoeba coli*, 68,5%), *S. stercoralis* (47,8%) y uncinarias (46,7%). Los estudios serológicos por ELISA mostraron que: 1) el 21,68% presentó Ac contra *Toxocara* (Melotec Biotechnology, Spain); 2) el 16% contra un Ag complejo de *L. mexicana*; 3) el 30% contra un Ag complejo de *T. cruzi* (F105) mientras que sólo el 17,6% presentó Ac contra un Ag específico de *T. cruzi* (Ag163B6). Se observaron alteraciones de los valores hematimétricos como leucocitosis, y valores bajos de Hto y Hb. El 61,8% de los individuos estudiados presentaron algún grado de anemia, correlacionando con la infección parasitaria intestinal descripta. Se observó una importante eosinofilia que en algunos casos alcanzó valores superiores al 50%, y alta correlación con la infección por helmintos. Sólo 10 pacientes infectados por helmintos (intestinales y *Toxocara*) tuvieron valores normales de eosinófilos. Consideramos que el presente estudio epidemiológico contribuye al mejor conocimiento de esta población aborigen y alerta sobre sus precarias condiciones de vida, que se expresan en la alta prevalencia de infección parasitaria.

EP27. Estudio retrospectivo sobre parasitosis intestinales en pacientes atendidos en el Hospital de Niños de Santa Fe. SOSA H, MENDICINO D, DI BENEDETTO N.

Sección Parasitología, Servicio de Diagnóstico Bioquímico, Hospital de Niños Dr. O. Alassia. Santa Fe. diegomendicino@hotmail.com

Objetivos: conocer la frecuencia de aparición de parásitos intestinales entre los niños atendidos en un nosocomio de la ciudad de Santa Fe, conocer las asociaciones parasitarias más frecuentes y observar la existencia o no de variaciones estacionales.

Material y métodos: se analizaron las muestras pertenecientes a 7996 pacientes atendidos en la Sección Parasitología del Hospital de Niños entre julio de 1997 y julio de 1999, siendo 5752 pacientes ambulatorios (A) y 2244 internados (I). Se examinaron 4155 coproparasitológicos seriados recolectados durante 5 días en formol al 5%, 5396

coproparasitológicos directos y 2122 escobillados anales por la técnica de la cinta engomada. Se observó con 100 y 400x de aumento con coloración de lugol sin previa concentración. Cuando se consideró necesario, se realizaron otras coloraciones (Giemsa, Ziehl-Neelsen, Tionina de Fröst, Hematoxilina-Eosina, Tinta China) o cultivo de Harada-Mori.

Resultados: el 22,8% de los pacientes estaban parasitados (349 I+1477 A= 1826). Sobre el total de parasitológicos positivos, la distribución fue la siguiente: *Blastocystis hominis* 60,2%; *Giardia lamblia* 40,4%; *Entamoeba coli* 18,0%; *Ascaris lumbricoides* 16,6%; *Enterobius vermicularis* 12,4%; *Entamoeba histolytica-dispar* 5,0%; *Hymenolepis nana* 3,1%; *Strongyloides stercoralis* 2,6%; *Trichuris trichura* 1,8%; *Cryptosporidium sp.* 1,4%; otros < 1%. Poliparasitados 556 (30,6%): con dos parásitos 453 (81,5%), con tres 95 (17,1%), con cuatro 6 (1,1%), con cinco 3 (0,3%). La asociación más frecuente fue entre *B. hominis* y *G. lamblia*, seguida por *B. hominis* más *E. coli* y *B. hominis* más *E. vermicularis*. No se observó variación estacional en el período analizado.

Conclusiones: la prevalencia es similar a la hallada en otros estudios realizados en el país. Se observa predominio de protozoos por sobre helmintos.

EP28. Prevalencia de Enteroparásitos en infantes de la localidad de Cayasta, Pcia. de Santa Fe. OPPEZZO JA, DANIELLI ME, MUGNI SA, MARCHETTI FM, ORIBONES ES.

Centro de Investigaciones sobre Endemias Nacionales (C.I.E.N.). Pje. El pozo 3.000 Santa Fe. Argentina jopezzo@fcb.unl.edu.ar

Las parasitosis en niños, tienen una prevalencia importante y ésta crece asociada a condiciones culturales y del medio ambiente. En éste trabajo se comunican los resultados de un relevamiento en una población infantil de la localidad de Cayastá, Provincia de Santa Fe. La población estudiada correspondió a 205 infantes de 0 a 14 años. Se realizaron muestras seriadas de materia fecal y escobillado perianal, examinándose en forma directa y previa concentración (Ritchie y Willis). Se relevó tipo y característica de vivienda, estructura familiar, provisión de agua, eliminación de excretas, ocupación y nivel de educación de los padres. Los resultados muestran que resultaron parasitados 113 niños, 65 lo fueron con un solo enteroparásito, del cual *Giardia lamblia* fue el predominante (41,5%), de los 48 infantes restantes, el 29,16% tuvieron asociación de *Giardia lamblia* - *Trichuris trichiura* (14 casos) y tres casos de cinco parásitos asociados, siendo *Trichuris trichiura* - *Entamoeba histolytica* - *Entamoeba coli* - *Giardia lamblia* los parásitos en comun. La mayor prevalencia se da en menores de 5 años. El relevamiento sanitario mostró que el 50 % de las familias estaba formada por 5 a 8 miembros, el 85,4 % poseía vivienda de material, el 46,4 % contaba con suministro de agua potable y el 74,4 % disponía de servicio sanitario instalado. El 78 % de los padres poseía instrucción primaria completa y el 58,5 % contaba con empleo estable. Los resultados obtenidos no están asociados a los factores predisponentes estudiados y citados en la bibliografía. Se concluye que las enteroparasitosis, en esta región, se encuentra instalada en la población y no dependen de las variables analizadas.

EP29. Prevalencia de parásitos intestinales en niños de zonas urbanas y rurales de Catamarca. MONFERRAN MC, SEGURA LA, MARCOLONGO R.

Lab. de Análisis Clínicos y Fac. Cs. Ex. y Naturales (UNCa) Catamarca- República Argentina; cmonfer@unca.catam.edu.ar

En la provincia de Catamarca, se han realizado escasos estudios sistemáticos para determinar las parasitosis intestinales más comunes que afectan a nuestros niños. A fin de contar con una primera aproximación sobre este particular, se realiza un muestreo en zonas urbanas de la ciudad capital y en comunidades rurales de dos departamentos del interior «La Paz» y «Santa María». Cada comunidad posee características culturales regionales propias y diferentes entre sí. Los ecosistemas donde se encuentran estas comunidades son climáticamente diferentes, pero todos en general son áridos y con baja precipitación anual. La recolección en total de 278 muestras seriadas de materia fecal de niños entre 1 y 14 años y sometidas a técnicas de enriquecimiento, arrojaron los siguientes resultados: la prevalencia de parasitosis intestinales en todas las comunidades es alta, hasta de un 67 %. La mayor frecuencia es de protozoosis como *Giardia lamblia* y *Entamoeba coli* seguidas en orden decreciente por *Blatocystis hominis*, *Entamoeba histolytica*, *Endolimax nana*, entre otras de menor ocurrencia. La prevalencia de helmintiasis como *Hymenolepis nana* es baja y menor para *Enterobius vermicularis* en este tipo de muestra. No se encontraron anquilostomas, estrongiloides ni trichurias. Como única geohelmintiasis importante *Ascaris lumbricoides* en un porcentaje del 2 %. En las zonas rurales se detectaron tres niños infectados con un género de *Trichostrongylus* por estar dedicados al cuidado del ganado. Se puede concluir que las parasitosis citadas están ligadas a la situación socioeconómica y normas higiénicas de las comunidades junto a un mal saneamiento ambiental, sistemas deficitarios de distribución de agua y eliminación de excretas y a algunas pautas culturales. Los niños en edad escolar son los más infectados. La ecología de las zonas actúa como barreras naturales para las geohelmintiasis impidiendo la evolución de huevos a formas infectantes, excepto de unos pocos en microclimas del suelo.

EP30. Enteroparásitos en una población escolar de Resistencia, Chaco. MATZKIN R, GALVÁN M, MERINO D, MIRANDA O, BALBACHÁN S.

Instituto de Medicina Regional, UNNE, Resistencia, Chaco. rmatzkin@bib.unne.edu.ar.

Con el objetivo de estudiar la prevalencia y distribución de parásitos entéricos en una población escolar, se realizó una encuesta entre alumnos de una escuela ubicada en el Barrio Villa Chica de la ciudad de Resistencia. Las muestras seriadas de materia fecal obtenidas de niños de 6 a 12 años (N=67) fueron procesadas por el método de Telemán modificado y flotación de Willis.; también se recogieron muestras de escobillado anal. Para la búsqueda de *Cryptosporidium* se utilizaron las coloraciones ácido resistentes de Kinyoun y Aureamina. En el 77,6% de las muestras estudiadas se hallaron parásitos, 28,4% de las mismas presentaron un único parásito, el 25,3% dos especies, y el 23,9% tres o más. La distribución de parásitos hallados fue la siguiente (en % sobre el total de muestras): Protozoos: *Blastocystis hominis* 31,3%, *Entamoeba coli* 20,9%, *Giardia lamblia* 14,9%, *Entamoeba histolytica-dispar* 9,0%, *Endolimax nana* 4,5%; Helmintos: *Enterobius vermicularis* 20,9%, *Hymenolepis nana* 19,4%, *Ascaris lumbricoides* 4,5%, Uncinarias 3,0%, *Strongyloides stercoralis* 1,5%. Ooquistes de *Cryptosporidium*

sp. fueron detectados en el 13,4% de las muestras. Los niños estudiados no reportaron episodios de diarrea, su peso y talla se encontraron todos dentro de los normales de acuerdo a la edad, y el único síntoma que acusaron algunos pacientes fueron cólicos abdominales. En cuanto a las condiciones sanitarias todas las casas disponen de agua corriente y eliminación sanitaria de excretas, pero se destaca el hacinamiento (4 o más personas por habitación) en que viven el 63% de los niños estudiados. El alto índice de infección por parásitos, sobre todo aquellos transmisibles por la vía fecal-oral y por agua, podría estar favorecido por el contagio intra-institucional de los niños; a la vez, estaría indicando un elevado nivel de infestación del medio ambiente. Cabe destacar la elevada prevalencia de *Cryptosporidium* observada, tratándose de niños que no sufren diarrea. Este dato sugiere la realización de estudios más amplios para determinar su prevalencia en la población general, y los niveles de contaminación de aguas de consumo y cursos de agua de la zona.

EP31. Estudio de prevalencia parasitológica en la población de un hospital Materno Infantil. GRIEVE S, SAUL M.

Hospital Materno Infantil San Roque, Paraná, Entre Ríos, Argentina. soubymys@satlink.com

Desde la implementación del sistema informático en el laboratorio central del hospital, se lleva un registro pormenorizado de los resultados de los estudios parasitológicos. Analizadas 4388 muestras en el período Enero '99 – Julio '00 se detectó un 24,6% de estudios cuyo resultado fue positivo. Detectándose en el 20,8% de los casos quistes de *Giardia lamblia*, en el 2,39% quistes de *Entamoeba histolytica*, en el 2,91% de los casos *Entamoeba coli* y en menor proporción huevos de *Hymenolepis nana*, *Trichuris trichiura*, huevos de *Taenia*, etc. Para orientar la búsqueda de la causa del elevado número de casos positivos, se cruzaron los datos de los casos positivos con relación al lugar de morada (dividiendo la ciudad en 14 zonas) de los pacientes. Se detecta un elevado número de casos en zonas de menores recursos sanitarios donde si bien los alimentos y bebidas contaminadas de quistes viables pueden ser una vía de infección probable, creemos en nuestro caso que el contagio se debe al contacto directo entre individuo infectado-individuo sano, donde las condiciones de saneamiento ambiental, el grado de cultura higiénica de la población afectada y en particular las deficiencias en los hábitos de limpieza personal no contribuyen a disminuir el grado de contagio.

Se propone elevar esta información a las autoridades sanitarias locales y provinciales debido a que estas carecen de información en estos momentos. Es de esperar que este alerta sirva para mejorar las condiciones de vida de los pacientes de menores recursos a través de políticas de salud orientadas a la prevención de las infecciones parasitarias y sus consecuencias.

EP32. Enteroparasitosis en población infantil de Merlo y área de influencia. CANOVA GM, SIRUR FLORES LM.

Hospital Zonal de Merlo. Merlo. San Luis. Argentina. Serceba@infovia.com

Se estudiaron 258 niños entre 6 y 14 años de edad durante el período bianual 1998-1999, con el fin de detectar la tasa de prevalencia de Helmintos y Protozoos de interés epidemiológico. Se indicó en todos los casos, recolección

seriada y escobillado anal durante siete días. El examen microscópico a 10X y 40X se realizó posteriormente al enriquecimiento por el Método de Bacigalupo y Ribero. Sobre el total de niños estudiados (258), se observaron parásitos en 107 (41 % de la población analizada), encontrándose una marcada prevalencia de Helmintos (*Enterobius vermicularis*: 20,54 % - *Ascaris lumbricoides*: 15,12 %), respecto a Protozoos (*Giardia lamblia*: 3,88 % - *Entamoeba coli*: 1,94 %).

La causa se encontraría en deficiencias en los niveles sanitarios y el hábitat rural.

EP33. Parasitosis intestinales más frecuentes en la población de Buena Esperanza y zona de influencia. BISTUÉ N, BONGIOVANNI L, PORTER M.

Laboratorio Hospital Buena Esperanza, Buena Esperanza, San Luis, Argentina.

El objetivo de este trabajo fue estudiar el, ó los agentes etiológicos más frecuentes, causantes de las enteroparasitosis en la población de Buena Esperanza y zona de influencia. Se analizaron 112 muestras de materia fecal -98 niños y 14 adultos-; a las que se le efectuaron estudios coproparasitológicos seriados: a cada muestra se le practicó una observación microscópica directa y otra previo enriquecimiento por el método de Charles Barthelemy modificado; encontrándose 45 muestras positivas(40,2%) con la siguiente distribución de enteroparásitos: *Giardia lamblia* 77,8%, *Enterobius vermicularis* 8,9%, *G.lamblia/Entamoeba coli* 6,7%, *Blastocystis hominis* 4,4%, *E. coli* 2,2%. Debido a la alta prevalencia de *Giardia lamblia* observada y a las condiciones socioeconómicas y sanitarias de los pacientes estudiados, se realizó una encuesta y observación en terreno a fin de establecer una relación entre las mismas y parasitosis De acuerdo a los parámetros analizados podemos considerar a *Giardia lamblia* como principal agente etiológico causante de las parasitosis intestinales en nuestra población, la que se halla favorecida por carencia de agua potable, mala eliminación de excretas (letrinas), con la consecuente contaminación de las napas subterráneas de agua que abastecen los pozos domiciliarios.

EP34. Study of Intestinal parasites in schoolchildren in a suburban area of Rio de Janeiro between April, 1999 to June, 2000. AMENDOEIRA MRR^{1,2}, MARTINEZ EM^{1,2}; CORREIA JAS^{1,2}, FREITAS GTP^{1,2}, OLIVEIRA GB^{1,2}, PEREIRA LCF¹, SILVA JP², SOUZA W JS², CAMILLO-COURA L²

1-NUDES-Fund.Tec.Educ. Souza Marques 2-FioCruz, . amendoei@gene.dbbm.fiocruz.br

Intestinal parasitic diseases are still an important public health problem, mainly in developed countries, where improvement of life conditions doesn't follow population increase. The infection risk is greater in schoolchildren, because they don't have correct hygiene habits. Therefore, we made a survey for intestinal parasites in schoolchildren between 5-15 years old, living in the suburb of RJ city, Brazil. The area presents urban precarious infra structures, and is located around College FTESM. Through educational lectures, and after authorization of children's responsible, 408 schoolchildren were researched, from these just 334 answered a questionnaire to evaluate epidemiological and social conditions. The fecal samples were collected fresh and conserved in MIF, to find helminthic eggs and protozoa cysts. The methods used for analysis were: Lutz, Kato-Katz and Willis (for fresh samples) and ether concentration method (for the

samples conserved in MIF). The positive children were treated, followed clinically and repeated fecal examinations after one month. The positivity to enteroparasites was 68,14%. The distribution of the helminthes in the population ranged from 29,4% (*Ascaris lumbricoides*) to 3,4% (*Vampyrolepis nana*), and the distribution of the protozoa infections ranged from 26,5% (*Entamoeba coli*) to 0,5% (*Iodameoba butschlii*). Concerning age, global positivity ranged from 64,8% (10-11 years old children) to 81,4% (12-15 years old children). Concerning sex we found: 51,6% (females) and 48,4% (males). Analyzing the questionnaire we observed 53% of children infected by protozoa that didn't drink filtered water, and 69,3% infected by helminthes had some kind of contact with soil. Studying separately the data obtained 74,82 positivity in 1999 and 54,58% in 2000 (until June) was. Our results suggest that the reduction of the positivity may be associated to: the treatment and clinical follow up of the positive children; the population prophylactic measures and/or slum urbanization/sanitation programs.

EP35. Larva migrans visceral en pacientes del nordeste argentino. REA MJF, ROSA JR, BORDA CE

Centro Nacional de Parasitología y Enfermedades Tropicales, Facultad de Medicina, UNNE, Corrientes, Argentina cborda@med.unne.edu.ar

Desde 1995 fueron derivados pacientes con marcada eosinofilia desde establecimientos asistenciales, con la finalidad de conseguir un diagnóstico diferencial con diversas patologías en el CENPETROP. Se exponen los resultados obtenidos y también el tratamiento con Ivermectina administrado por primera vez en la región a una paciente. Fueron asistidas 45 personas de ambos sexos y edades de seis meses a 59 años procedentes de las provincias de Corrientes, Chaco, Formosa y Misiones, que tenían eosinofilia relativa comprendida entre 10 y 70%. En estos pacientes se registró en 14 (31%), sintomatología que consistió en retinopatía, estrabismo divergente, endoftalmitis, uveitis, corioretinitis, ceguera unilateral, panuveitis granulomatosa, dolores musculares, anemia, trastornos respiratorios hepatomegalia, poliadenopatías y epigastralgia. Los restantes solo registraban eosinofilia sin sintomatología. En todos se realizó la técnica cualitativa de ELISA con antígeno purificado secretor de estadios larvales de *Toxocara canis* (BIOTRIN International, Francia) y dilución del suero 1/100 y solamente en 23 se efectuó coproparasitológico seriado y colecta de mucus anal. En 29 (64,4%) se detectaron anticuerpos de larva migrans visceral, de los cuales 16 eran hombres y 13 mujeres. Además 10 de esas personas eliminaron con sus heces larvas de *Strongyloides stercoralis*. De todos estos pacientes, en una niña de tres años que padecía de endoftalmitis y estrabismo divergente, se administró Ivermectina (3mg cada 15 días durante seis meses) asociado con corticoides sistémico y locales. Después del cuarto control oftalmológico no se registraron signos de evolución parasitaria y no se presentan reacciones adversas al medicamento. No existe antecedentes de tratamiento con Ivermectina en niños de esa edad.

EP36. Trichinellosis en Bahía Blanca (Argentina) - 1998-1999. COSTAMAGNA SR*, JOUGLARD M**, DUPIN J*; GARCÍA S*, VISCIARELLI E*.

*Cátedra de Parasitología Clínica. Universidad Nacional del Sur. San Juan 670 (8000) BAHIA BLANCA (Argentina) **Departamento de Zoonosis y Bromatología. Municipalidad de Bahía Blanca. rcostama@criba.edu.ar

La Provincia de Buenos Aires es área endémica de Trichinellosis, zoonosis que el hombre adquiere por ingesta carne de cerdos cruda o mal cocida infestada por el estadio larvario de *Trichinella sp.* enquistada en la musculatura estriada de los mismos. Bahía Blanca, especialmente en los últimos años ha debido soportar dos importantes brotes, que significaron en 1997 el 70% del total de casos anuales provinciales, pese a que su población solamente representa un 2,4 % de la provincia, con un caso mortal y una morbilidad que llegó a los 440 casos en 1997 (notificados: 279). Por este motivo es que desde nuestro laboratorio de Parasitología Clínica comenzamos con estudios epidemiológicos a fin de conformar un estado de situación de esta zoonosis que permita a las autoridades sanitarias adecuar los programas de erradicación y control. Para ello comenzamos con la búsqueda de reservorios no humanos en la ciudad; en esta primer etapa se efectuó investigación de quistes de *T. spiralis* en musculatura estriada de ratas silvestres (n: 20) y perros de un sector periférico (Villa Miramar) (n: 20) de la ciudad de Bahía Blanca. Las búsquedas se efectúan por triquinoscopias directas y previa digestión enzimática según técnica del Departamento de Zoonosis de Azul (Pcia. de Buenos Aires). Asimismo se investigaron las denuncias de brotes realizados al municipio de esta ciudad durante los últimos dos años.

Como resultado de nuestras observaciones registramos lo siguiente: Investigación de Trichinellosis durante 1998 y 1999 (Total de estudios efectuados en cerdos):

	Lab. oficiales	Veterinarias-Lab. privados	Frigorífico provincial
1998	245	165	8740
1999	135	188	8516

Brotes registrados en porcinos: Año 1998: 12 brotes (total provincial: 66): 18%; Año 1999: 2 brotes (total provincial: 65): 3% y hasta julio de 2000: 5 brotes. En este estudio preliminar, en perros y ratas no se encontró ningún animal infestado. Los estudios continúan a efectos de encontrar datos más precisos referidos a la verdadera prevalencia de enfermedad en animales de la ciudad y poder evaluar nuevas medidas para el control de la enfermedad. No se pudieron encontrar registros del total de animales faenados en la ciudad.

EP37. La esquistosomosis de Manson, riesgo de su propagación al nordeste argentino y el Paraguay. BORDA CE, REA MJF, BENITEZ O, MOSQUEDA LA

Centro Nacional de Parasitología y Enfermedades Tropicales, Facultad de Medicina, UNNE, Corrientes, Argentina cborda@med.unne.edu.ar

Actualmente existen focos endémicos de esquistosomosis, hacia el sur del Brasil, algunos de antigua data, como los ubicados en el estado de Paraná, y otros más recientes en Santa Catarina y Río Grande do Sul, estados limítrofes con el nordeste de la Argentina y el Paraguay. Ante esta situación epidemiológica se ha estudiado el rol que podrían cumplir en la cuenca del río Paraná la *Biomphalaria tenagophila* como transmisora potencial de la enfermedad. Con tal objetivo se estudió, desde 1998 hasta este año, la susceptibilidad y compatibilidad de 974 *B. tenagophila* (4 a 8mm de AE) procedentes de siete localidades a miracidios (10 por caracol) a dos cepas de *Schistosoma mansoni* originarias del Brasil: SJ2 y SR adaptadas a esa especie de

planorbido. En el CENPETROP estas cepas se mantienen por pasajes sucesivos caracol simpátrida-roedor (hamster, ratón)-caracol simpátrida. De la provincia de Corrientes, con la Cepa SJ2 no se infectaron los caracoles de Caá-Catí, por el contrario, se infectaron y se clasificó la compatibilidad en los de Rincón de Vences (7% y Clase II), Goya (22% y Clase III), Maloyas (5% y Clase III), Berón de Astrada (3% y Clase III), originarios de la provincia de Misiones los de Posadas (11% y Clase II) y de Encarnación del Paraguay (20% y Clase III). Además los caracoles de Berón de Astrada también se infectaron con la cepa SR (27%) y fueron muy compatibles (Clase V). Estos resultados indican claramente que en las aguas superficiales cercanas a afluentes, tanto de las márgenes izquierda y derecha del río Paraná, existen poblaciones de *B. tenagophila* que por ser susceptibles y compatibles al *S. mansoni*, tornan de alto riesgo la propagación de la esquistosomiasis al nordeste argentino.

EP38. Método comparativo de recolección mediante Hisopos o Gasa para recuperación de huevos de *Enterobius vermicularis*. GRIEVE S, ANSELMINO L, SAUL M.

Hospital Materno Infantil San Roque, Paraná, Entre Ríos, Argentina. soubymys@satlink.com

En una primera etapa de este estudio, se procesaron 2784 muestras para la detección de huevos de *Enterobius vermicularis*, resultando 7,7% (216) positivas y 9% (253) muestras recolectadas deficientemente.

Se propuso entonces mejorar la efectividad de la recolección, indicándose a los pacientes 2 técnicas de toma de la muestra: a) por hisopado anal o b) por limpieza de las margenes anales con gasa. Se evaluaron durante 4 meses 539 muestras, encontrándose a semejanza del lote anterior, 86,5% de resultados negativos. Respecto de las muestras positivas, el 37% lo fue por ambas técnicas, el 55% sólo fue positivo por la recolección con gasa y sólo el 8% resultó positivo por hisopado anal solamente. Los datos obtenidos muestran que la técnica de recolección con gasa resulta más efectiva para la recuperación de huevos de *E. vermicularis*. Teniendo en cuenta además que la recuperación de una buena toma de muestra, permite evitar las repeticiones debido a la simpleza de la recolección y la fácil comprensión del método por parte del paciente, se contribuye a aumentar la eficiencia en la detección de los huevos de *E. vermicularis*.

EP39. Aporte del Hemograma al Diagnóstico de Parasitosis Intestinales. SUAREZ J, SUÑER M E, GIBOIN C, LOHAIZA A M.

Laboratorio de Análisis Clínicos Centro Periférico N° 3. Complejo Sanitario San Luis. San Luis. Argentina. analohaiza@latinmail.com

Frecuentemente en pediatría, las parasitosis intestinales, constituyen un problema en lo que se refiere a su diagnóstico y terapéutica. El presente trabajo tiene el propósito de complementar el diagnóstico parasitológico.

Materiales y Métodos: Muestras fecales seriadas (7 días) recolectadas en formol al 10% y mucus anal recolectado con gasa durante igual período. Se realizó examen macroscópico, microscópico directo y previo enriquecimiento, utilizando técnicas de Telemann modificado, Willis y de Baermann. Se recogieron muestras sanguíneas para hemograma, cuyos resultados se obtuvieron mediante el uso del contador hematológico Coulter T-540 y las fórmulas leuco-

citarias se realizaron observando microscópicamente el extendido coloreado con la técnica de May Grumwald- Giemsa.

Resultados: En 227 muestras fecales y sanguíneas de niños de 3 a 12 años, se observó que el 47,57% presentaban parásitos; de esas muestras, en el hemograma, el 45,37% presentaron eosinofilia, mientras que para los valores de hematocrito y hemoglobina, el 16,66% de esas muestras positivas presentaron signos de anemia. En cuanto al comportamiento de los leucocitos, concluimos que el 19,44% de las muestras parasitadas presentaban leucocitosis mayor de 10.000 leuc./ mm³.

Estos valores concuerdan con los descriptos en la literatura sobre el tema, mostrando que la eosinofilia acompaña generalmente las parasitosis intestinales.

EP40. Enfermedad de Chagas Congénita en la Pcia. de Salta. Búsqueda parasitológica, seguimiento y control. MORA M, SÁNCHEZ NEGRETTE O, MARCO J, SEGURA M, RAMOS F, UNCOS D y BASOMBRÍO M.

Laboratorio de Patología Experimental. Fac. Cs. Salud. Universidad Nacional de Salta. Argentina. moram@unsa.edu.ar.

En nuestra provincia, la prevalencia infección por *T. cruzi* en embarazadas supera el 15%, razón por la cual nacen muchos niños con infección congénita anualmente. La detección precoz de estos casos no se realiza sistemáticamente, y suelen pasar inadvertidos y sin tratamiento. Para el diagnóstico de ésta enfermedad en nuestro laboratorio se desarrollan métodos sensibles. Son estudiadas muestras de sangre de cordones umbilicales o punciones venosas de recién nacidos, Hijos de Madre Chagásica (HMCH) con técnicas parasitológicas: Microstrout (MS), Hemocultivo (H), y Reacción en Cadena de Polimerasa (PCR). La búsqueda se lleva a cabo en forma prospectiva y sistemática. Aquellos bebés a los que se les detecta infección son tratados inmediatamente. A los 6 meses y al año de vida todos los HMCH son estudiados serológicamente con las técnicas de HAI y ELISA, previa toma de muestra domiciliaria. La extinción de los anticuerpos contra *T. cruzi* al año de vida del niño es prueba certera de que no existe infección congénita, constituyendo además una adecuada forma de control del diagnóstico precoz que intentamos realizar al nacimiento. La tasa de transmisión congénita detectada parasitológicamente fue de 5,88% en 12/204 HMCH. A esta cifra se le sumaron cinco niños que tuvieron anticuerpos persistentes, indicadores de infección. Ellos habrían pasado los estudios parasitológicos sin ser detectados, y por los datos epidemiológicos no estaríamos ante un caso de infección vectorial o transfusional. Por lo tanto la tasa de detección ascendería a 8,33% (17/204). Con los métodos propuestos, inmediatos y diferidos, la transmisión madre-hijo de la Enfermedad de Chagas podrá ser controlada, ya que a mayor ajuste en la búsqueda aumenta la tasa de transmisión encontrada.

Agradecimientos: Residencias Tocoginecología y Neonatología y Servicio serología, Hospital Materno Infantil de Salta. Centro de Salud N°15 y Hospitales del Interior de la Provincia.

Subsidiado por FONCYT, CIUNSA y Ministerio Educación de la Pcia. de Bs.As.

EP41. Screening de Chagas en pacientes del Hospital de Naschel. MARTÍNEZ C*, QUIROGA P**

Hospital de Naschel*, Hospital de Concarán**, San Luis, Argentina.

La localidad de Naschel se encuentra en zona endémica con relación al mal de Chagas.

Objetivos: Determinar la prevalencia de la infección por técnicas serológicas en pacientes que concurren al Laboratorio por otro tipo de patologías. Derivar al paciente chagásico a la atención médica.

Materiales y métodos: se procesaron simultáneamente por HAI Y ELISA, 313 sueros pertenecientes a pacientes de distintas edades y sexos (10% del total de la población).

Resultados:

Edades	Nº de muestras	Prevalencia
2 a 12	61	3,3%
13 a 45	135	13,3%
más de 45	117	42,7%

Conclusiones:

- 1 La prevalencia aumenta con la edad.
- 1 La alta prevalencia entre adultos se relaciona a las condiciones sociales, culturales y económica originadas en el tipo de muestra estudiada.
- 1 El bajo índice en los niños se atribuye al mejoramiento de la vivienda. Desde 1983 el Gobierno ha construido 518 casas de ladrillo, las que habitan núcleos familiares de más de 5 personas, en su mayoría niños.
- 1 Este trabajo será ampliado al resto de la población de Naschel con la finalidad de que sea representativo.
- 1 Los pacientes seropositivos están siendo evaluados por el personal médico del Hospital.

EP42. Prevalencia de Chagas en localidades de Rivadavia Banda Norte, Provincia de Salta. SANCHEZ NEGRETTE O, MARCO JD, DIOSQUE P, PADILLA AM, DAVIES C, RAMOS F, MORA MC, BASOMBRIOMA.

Lab de Patología Experimental. Fac. de Ciencias de la Salud. UNSa. olgasan@unsa.edu.ar

En junio de 1993 se realizó un rociado masivo con piretroides en todas las viviendas del Dpto. Rivadavia, Prov. de Salta. Desde entonces se mantiene la vigilancia con la participación comunitaria y el rociado selectivo. La seroprevalencia para adultos en ese año en la localidad de San Patricio fue de 69%. Actualmente en esa comunidad viven 22 familias de la etnia Wichi y concurren a la escuela niños aborígenes y criollos. En julio de 2000 se realizó un relevamiento serológico en escuelas de las localidades de Morillo, Resistencia, El Espinillo y San Patricio, del mencionado departamento. La zona estudiada es considerada de riesgo entomológico aún cuando la provincia se encuentra en etapa de vigilancia. Se realizaron las pruebas de Hemaglutinación Indirecta (Polychaco) y Elisa (Wiener) a un total de 190 personas, considerándose positivas aquellas que tuvieran dos reacciones positivas y en las discordantes se realizó test de inmunofluorescencia. En la localidad de San Patricio se estudiaron también 29 perros por Elisa. Los resultados serológicos para humanos son los siguientes:

Edad (años)	Morillo	S.Patricio	Resistencia	El Espinillo	% Posit
1 – 9	0 / 8	0 / 20	0 / 6	0 / 8	0
10 – 18	2 / 69	1 / 27	0 / 11	3 / 10	5.12
> 18	5 / 12	10 / 12	2 / 5	1 / 2	58.06

Se ha logrado una disminución en la infestación domiciliar puesta que no detectamos infección en niños menores de 9 años, tampoco en los perros, los cuales no superan esa edad. En los jóvenes con serología positiva entre 10 y 18 años (5,12%) no se descarta la posibilidad de infección congénita o transfusional. El último grupo etéreo promedia los 34 años, por lo que se puede considerar que fueron infectados antes de la primera fase de ataque en 1970. Subsidiado por: FONCYT, CONICET y CIUNSA. Agradecimientos: Dr. E Campos. Hosp. Morillo. Ctro de Salud Los Blancos. Direct de escuelas de la zona. Prog Nac de Control de Vectores Salta.

EP43. CONOCIMIENTOS SOBRE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS EN UNA POBLACION RURAL DEL NORDESTE DE LA ARGENTINA. LOPEZ BORDA C, REA R.

Centro Nacional de Parasitología y Enfermedades Tropicales, Facultad de Medicina, UNNE, Corrientes, Argentina cborda@med.unne.edu.ar

Entre agosto a diciembre de 1999 se comenzó una encuesta en Costa Grande, zona rural del departamento de San Luis del Palmar en la provincia de Corrientes (nordeste de la Argentina). En este lugar la enfermedad de Chagas es endémica y su población está en alto riesgo de contraer la enfermedad porque no existen actividades de control. En otras zonas del mismo departamento habíamos detectado en 1998, un 28% de las viviendas infestadas con *Triatoma infestans* y de éstos el 22 % con *Trypanosoma cruzi*. La transmisión activa se demostró con el hallazgo de dos casos agudos de la enfermedad y el 20% de las personas con anticuerpos. El objetivo de esta encuesta fue investigar el nivel socioeconómico y educativo, los conocimientos sobre la enfermedad de Chagas, sus mecanismos de transmisión y la prevención. En el paraje vivían 389 personas que habitaban en 76 viviendas. Cada hogar fue elegido en forma aleatoria utilizando un cuestionario de 23 preguntas formuladas a los miembros mayores de 15 años. Fueron encuestadas 16 viviendas (26%), todas de estructura precaria, donde solo el 35% de los habitantes eran propietarios. En estas viviendas vivían 100 personas (27% de la población de Costa Grande). El 14% era analfabeto y aunque el 86 % podía leer y escribir, solo el 23 % tenía estudios primarios completos. De las 36 personas entrevistadas, el 64% conocía la vinchuca y apenas el 39% sabía de sus hábitos alimenticios, aunque el 69% ignoraba en que lugar de la vivienda se refugiaban. El 86% no relacionó al triatomino como transmisor de esta enfermedad y solo el 5% la mencionó como causa de infección cardíaca crónica. Como medidas preventivas, los que conocían el uso de los insecticidas alcanzaba al 11%. Este trabajo aún no ha finalizado, pero estos resultados inducen a pensar que es utópico controlar esta enfermedad basados en acciones químicas discontinuas y sin contigüidad, sin priorizar a la educación y el mejoramiento socioeconómico.

EP44. Primer relevamiento de prevalencia serológica de infección chagásica en poblaciones caninas de un área del monte Impenetrable Chaqueño. ¹IACHINI R H, ¹ARCHILLA JG, ²VELAZQUEZ E, ¹GRAMAJO FO y ³LAURICELLA M

¹Instituto de Zoonosis "Luis Pasteur" del Gobierno de la Ciudad de Buenos Aires, . Argentina. *pasteur@correo.secyt.gov.ar* ²Instituto Nacional de Parasitología "Dr. Mario Fatała Chabén". ANLIS. Buenos

Aires. Argentina. ³Instituto Nacional de Producción de Biológicos. ANLIS. Buenos Aires. Argentina. *fatalachaben@yahoo.com*

Se realizó un relevamiento de carácter serológico, parasitológico y clínico veterinario de la población animal de las comunidades aborígenes tobas y criollas pertenecientes al departamento de Gral Güemes de la Pcia de Chaco , en 15 parajes distribuidos en un área de 150.000 ha. , cedidas por el estado a las comunidades aborígenes, este trabajo se encuentra comprendido en un marco de colaboración comunitaria conjunta de Instituciones Oficiales de la Salud y Educativas con los pobladores de la zona. El área de estudio está comprendida entre los ríos Teuco y Bermejito, a unos 70 km. al norte de Castelli, la población mas cercana, la distancia entre parajes es de 8-15 km. Las viviendas tienen techo de paja , paredes de adobe en solo 2 ó 3 de sus paredes y piso de tierra donde humanos y perros conviven en las áreas de dormitorios. Se sangraron 175 perros por venopunción yugular para realizar estudios serológicos para detectar anticuerpos anti-*T.cruzi* y otras patologías. Se realizaron para tal efecto las reacciones de Inmunofluorescencia Indirecta y ELISA. Todos los sueros reactivos para Chagas están siendo procesados por Immunoblotting para identificar proteínas reconocidas por esos sueros de los perros infectados.

La prevalencia de infección chagásica global fue de 24.7% (42/170). Los cinco sueros restantes (2.8%) fueron discordantes entre ambas técnicas. Se observaron marcadas diferencias zonales en los valores de prevalencia detectados en 3 parajes todos con predominio de comunidad criolla. Mientras que en un paraje , La Bolsa, solo se detectó un suero (de un total de 16) con Inmunofluorescencia positiva, en otros dos , Las Tunillas y El Mojo, se observaron prevalencias del 28.9% (13/45) y 29.2% (7/24) respectivamente, a pesar de mostrar similares características ambientales, sanitarias y sociales.

EP45. Enfermedad de Chagas en el Dpto. Chacabuco, Chaco, Argentina: seroprevalencia en humanos de cuatro localidades. DIOSQUE P, CIMINO R, ZACCA R, JUAREZ A, MEZA C, ROJO H, REY R, NASSER J, BASOMBRÍO MA.

Laboratorio de Patología Experimental, Facultad de Ciencias de la Salud, Cátedra de Química Biológica, Facultad de Ciencias Naturales, Universidad Nacional de Salta, Salta, Argentina. diosqu@hotmail.com.

En junio de 1999 realizamos un relevamiento serológico en pacientes de cuatro parajes del Dpto. Chacabuco, en el sudoeste de la provincia de Chaco. En el área estudiada se realizó una campaña de rociado masivo con deltametrina a fines del año 1996. Se colectaron *Triatoma infestans* intradomiciliarias de las cuales se examinaron microscópicamente las heces (400x) para la detección de tripanosomas. Se estudiaron mediante las técnicas de ELISA y HAI 353 pacientes (rango de edad: 0-60 años). Fueron considerados positivos aquellos individuos reactivos para ambas técnicas. La seroprevalencia general fue de 30.30%; en pacientes de 0-15 años fue de 28.67% (n= 286) y en pacientes mayores de 15 años fue de 40.30% (n= 67; rango de edad 16-60 años). No se pudo evaluar el efecto del rociado sobre la seroprevalencia de niños nacidos después de la campaña de rociado masivo ya que el tamaño de muestra fue pequeño (n=12; prevalencia= 8,33%). Se detectó infección por *T. cruzi* en vinchucas de 5 viviendas, lo cual es un fuerte indicio de que al menos en focos puntuales, la transmisión

vectorial se estaría produciendo. La presencia de vectores domiciliarios en localidades con seroprevalencias como las halladas en el área estudiada, representan un serio riesgo para la población expuesta.

Agradecimientos: Wiener lab., Hospital Enrique V. de Llamas (Charata, Chaco); J. Nasir; C. Spillman; E. Rojas.

EP46. Seroprevalencia en perros naturalmente infectados con *Trypanosoma cruzi* de una región endémica para Chagas- Prov. del Chaco. CIMINO R, DIOSQUE P, MEZA C, NASSER J, BASOMBRÍO M.

Cátedra Química Biológica, Fac. Cs. Naturales. LaPE, Fac. Cs. de la Salud. UNSa, Salta, Argentina. rcimino@unsa.edu.ar

Con el propósito de conocer la situación epidemiológica de un área endémica para Chagas, durante el período 1999 – 2000 se realizó un estudio serológico a 137 perros pertenecientes a las villas rurales Tres Estacas (3E) y El Picazo (EP), Departamento Chacabuco, Chaco. El área estudiada fue rociada con deltametrina en 1996. Las muestras de sangre se extrajeron por veno-punción siendo recogidas en capilares heparinizados y conservadas en buffer PBS-glicerol al 30 %. Las mismas se analizaron mediante la técnica de ELISA, utilizando como antígeno un Homogenado Proteico de *T. cruzi* de la cepa Tulahuén (HPTUL) y el antígeno SAPA (Shed Acute Phase Antigen). Los perros fueron considerados serológicamente "positivos" para la infección chagásica cuando los sueros eran reactivos para ambos antígenos. Se visitaron el 48 % (60/125) de las viviendas de los parajes mencionados, observándose una media de 2,8 perros por viviendas. La seroprevalencia canina del lugar fue del 22,6 % (31/137). Se detectó la presencia de *Triatoma infestans* en algunos domicilios y peridomicilios. Estos resultados indican una seroprevalencia en perros relativamente baja con respecto a estudios realizados por otros autores, posiblemente como consecuencia del último rociado que se hizo con deltametrina. La presencia de perros infectados y la del vector en algunas viviendas representa un riesgo potencial para la transmisión del *Trypanosoma cruzi* en ambientes domésticos, dada la alta capacidad de estos animales para infectar vectores. Este trabajo revela que los perros domésticos están actuando como reservorios naturales del *T. cruzi* y en presencia de vinchucas domiciliarias, se prevé un potencial aumento en la tasa de infección de humanos, si no se toman las medidas correspondientes y más aún teniendo en cuenta que puede hacerse extensiva a parajes vecinos.

Subsidiado por Consejo Investigación Universidad Nac. de Salta y CONICET.

EP47. Persistente disminución de la seroprevalencia para *Trypanosoma cruzi* y nuevos casos de infección en una población de perros en una área rural bajo vigilancia en Santiago del Estero, 1992-2000. CASTAÑERA MB¹, LAURICELLA MA², GÜRTLER RE¹.

¹Depto. de Ciencias Biológicas, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales-UBA. ² Instituto Nacional de Producción de Biológicos-ANLIS « Dr. Carlos G. Malbrán».

En el noroeste argentino, el perro es el principal reservorio doméstico de *Trypanosoma cruzi*, y puede ser utilizado como centinela natural de la transmisión de *T. cruzi*. En Amamá y localidades vecinas (Santiago del Estero), las que se encuentran bajo vigilancia de la reinfestación domiciliar por *Triatoma infestans* desde 1992, se censó a la pobla-

ción de perros en Mayo de 2000, se obtuvieron muestras de sangre por punción de la vena femoral, y los sueros se conservaron a -70°C . La detección de anticuerpos anti-*T. cruzi* se realizó por HAI (Polychaco), ELISA e IFI. Un individuo fue considerado seropositivo cuando 2 de las 3 técnicas resultaron concordantes. Se registraron 285 perros en 99 viviendas visitadas (3 perros/casa). El 64% tenía 3 años o menos de edad. La seroprevalencia de *T. cruzi* en la población de perros había disminuido desde el 65% en 1992 (pre-rociado) al 38% (70/182) en 1994 y al 15% (36/237) en 1996, y nuevamente bajó al 8,9% (19/214) en 2000. Se detectaron 4 casos nuevos de infección por *T. cruzi* serológicamente concordantes, todos perros nativos y sin historia de viaje fuera del área. Al menos uno de ellos provenía de madre seronegativa a *T. cruzi*. No se detectaron perros seropositivos entre 46 perros nativos cuyas madres eran seronegativas a *T. cruzi* en el 2000, pero hubo 2 (33%) seropositivos de 6 perros nativos cuyas madres eran seropositivas. También se detectó un perro adulto sin historia de viaje, el que pasó de seronegativo en 1996 a seropositivo en 2000. Estos datos reafirman que cuando *T. infestans* se halla fundamentalmente restringida al peridomicilio y con porcentajes de infección por *T. cruzi* del 2-5%, existe una persistente ocurrencia de casos de *T. cruzi* en los perros jóvenes nativos, algunos de los cuales no pueden ser explicados por una eventual transmisión congénita del parásito ni por historia de viaje. Probablemente exista un ciclo peridoméstico de transmisión de baja intensidad, pero aún no se halla firmemente establecido si el vector es *T. infestans* u otro triatomino peridoméstico.

EP48. Zimogramas de aislados de *Trypanosoma cruzi* del Dpto. Chacabuco, Chaco, Argentina. DIOSQUE P, DE LUCA D'ORO G, CIMINO R, MEZA C, NASSER J, MONTAMAT E, BASOMBRÍO M.

LaPE, Fac. Cs. de la Salud; Cat. Química Biol., Fac.Cs.Nat., unas,Salta, Argentina.: diosqu@hotmail.com.

Con el propósito de analizar la variabilidad genética de las poblaciones naturales de *Trypanosoma cruzi* provenientes del Dpto. Chacabuco, en el sudoeste de la provincia de Chaco, se estudiaron los patrones electroforéticos de 6 enzimas en 10 aislados. De los 10 aislados estudiados, 5 fueron obtenidos de perros mediante xenodiagnóstico y los restantes 5 a partir de *Triatoma infestans* intra-domiciliarios. Se estudiaron las siguientes enzimas: alcohol deshidrogenasa (ADH), aspartato aminotransferasa (ASAT) enzima málica (ME), fosfoglucomutasa (PGM), glucosafosfato isomerasa (GPI) y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PD). En este trabajo presentamos los resultados obtenidos para ADH, ASAT y PGM, las cuales mostraron una buena definición de los patrones electroforéticos. Todos los aislados mostraron idéntico patrón para ADH, representado por una única banda que presentó menor velocidad de migración que el zimodemo Z12 Argentina, el cual fue utilizado como control. Las bandas obtenidas para PGM y ASAT permitieron diferenciar dos patrones. El primero, hallado en 4 de los 5 aislados de perros y en 3 de los 5 aislados provenientes de vinchucas, presentó un patrón de dos bandas para PGM y una única banda para ASAT. El segundo patrón, hallado en un aislado proveniente de perro y en dos aislados provenientes de *Triatoma infestans*, presentó un patrón con una banda única para PGM y dos bandas para ASAT. Estos resultados muestran que, para las enzimas analizadas, se puede inferir la existencia de al menos dos grupos distintos de parásitos circulando en esta zona y que posiblemente

ambos serían bastante frecuentes ya que en solo 10 aislados analizados estuvieron representadas ambas variedades del parásito. Estudios posteriores, aumentando el número de muestras, permitirán examinar esta hipótesis.

Agradecimientos: N. Gardenal, M. Padilla, D. Marco, A. Uncos, F. Ramos, R. Rossi y G. Nores. Este trabajo fue financiado por CONICET y CIUNSA.

EP49. *Trypanosoma (Schyzotrypanum) sp.* Isolated From Bats in Southern Brazil. A Distinct Trypanosome Species? GRISARD E.C.¹, DAMBRÓS B.P.¹, EGERMANGRICH I.¹, CAMPBELL D.A.², ROMANHA A.J.³ & STEINDEL M.¹

¹Departamento de Microbiologia e Parasitologia - UFSC, Cx. postal 476, Florianópolis, SC, Brazil, 88040-900;

²Department of Microbiology and Immunology, UCLA/USA and ³Centro de Pesquisas René Rachou, Fiocruz, MG, Brazil. grisard@ccb.ufsc.br

Trypanosoma (Schyzotrypanum) sp. strains isolated from bats *Eptesicus sp.* were characterized using experimental infection in mice, triatomines and culicines, "in vitro" cell infection assays, indirect fluorescence (IFA), isoenzymes, RAPD and spliced leader gene (SL) analysis. These isolates were compared with *T. cruzi*, *T. rangeli* and three other bat trypanosome species, *T. vespertilionis*, *T. c. marinkellei* and *T. hastatus*. Experimental infection of triatomines and culicines with *Trypanosoma sp.* proved to be transitory, and these parasites were non infective for both normal and immunosuppressed mice. These parasites were able to sustain infection in both Vero and L929 cell lines. Polyclonal sera raised against the bat *Trypanosoma sp.* reacted weakly with only *T. cruzi* in IFA assays. The isoenzymatic and RAPD profiles were quite distinct from *T. cruzi* and *T. rangeli* and more related to *T. vespertilionis* and *T. hastatus* suggesting an evolutionary relationship with the other bat trypanosomes. The SL sequence analysis allowed specific differentiation from all the other species. Our results indicate therefore that *Trypanosoma sp.* isolated from *Eptesicus sp.* is a distinct bat trypanosome species.

Supported by UFSC, CNPq, Capes (Brazilian Government Agency).

EP50. The ethiological agent of Mal de Cadeiras: Biological, biochemical and molecular aspects of isolates of *Trypanosoma evansi* from the Pantanal of Mato Grosso (Brazil). QUEIROZ AO*, NEHME-RUSSELL NS², BRANDÃO A *1, CABELLO PH³, LEGY PA*, XAVIER SCC, ARAUJO CAC*, JANSEN AM*

^{*}Departamento de Protozoologia-Laboratório de Biologia de Tripanosomatídeos, Instituto Oswaldo Cruz / FIOCRUZ, ¹ Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Instituto Oswaldo Cruz/FIOCRUZ, ² Departamento de Medicina Tropical, Instituto Oswaldo Cruz/FIOCRUZ, ³ Departamento de Genética, Instituto Oswaldo Cruz/FIOCRUZ. *aqueiroz@gene.dbm.fiocruz.br.

Trypanosoma evansi is a salivarian Trypanosomatid that causes, mainly in horses, a severe disease known in Brazil as "Mal de Cadeiras". This enzootic disease is prevalent in the Pantanal of Mato Grosso, a region where farming is highly horse-dependent, being responsible for severe economical losses.

In spite of being the trypanosomatid with the broadest geographical distribution and host range, many aspects concerning the biology and biochemistry of this species remain to be clarified. In order to better comprehend these aspects we studied biological, biochemical and molecular

parameters of *T. evansi* isolates derived from domestic and sylvatic animals from the Pantanal of Mato Grosso. Our data suggest that: 1) subpopulations of *T. evansi* circulate in overlapping transmission cycles in the Pantanal do Mato Grosso, 2) significant differences in virulence patterns, not correlated with the host species, were observed, 3) molecular and biochemical markers frequently used to distinguish different trypanosomatids subpopulations, are not suitable to study trypanosomiasis caused by *T. evansi*, 4) No correlation on between biochemical and molecular parameters and biological characteristics of the parasite could be established.

EP51. Detección de Anticuerpos contra *Trypanosoma cruzi*, *Toxoplasma gondii* y *Toxocara canis* en una población de trabajadores rurales. SALOMÓN C, TONELLI R, BORREMANS G, MANA C.

Cátedra de Parasitología, F.C.M., U.N. de Cuyo, Mendoza, Argentina csalomon@fmed2.uncu.edu.ar

Introducción: Dado que el ecosistema rural es favorable al desarrollo de vectores y la tierra puede ser vehículo de formas infectantes de diversos parásitos, las personas que trabajan en su cultivo y/o viven en áreas rurales están expuestas a contraer diferentes infecciones parasitarias.

Objetivo: determinar la presencia de Ac contra *Trypanosoma cruzi*, *Toxoplasma gondii* y *Toxocara canis* en una población de trabajadores rurales, detectar el grupo etario más afectado y establecer la relación presencia de infección/eosinofilia.

Materiales y Métodos: Se estudiaron los sueros de 84 varones adultos (21 a 63 años) con vivienda y lugar de trabajo en Los Cajones, Villa Dolores, Córdoba. Para detectar la infección por *T. cruzi* y *T. gondii* se utilizaron los métodos de HAI y TIF con equipos comerciales; se consideró positivo todo suero con títulos iguales o superiores a 1/32 por ambas técnicas para cada infección parasitaria; para *T. canis* se utilizó ELISA IgG/IgM con Ag excretor/secretor de procedencia comercial considerándose positivo todo suero con una lectura 10% superior la valor de cut-off.

Resultados:

	NEG.	POS.	% POS.	GRUPO ETARIO
Ac. <i>T. cruzi</i>	66	18	21,4	40- 50 años
Ac. <i>T. gondii</i>	50	34	40,7	40- 50 años
Ac. <i>T. canis</i>	75	9	10,7	No se observa

Tanto para *T. cruzi* como para *T. gondii*, el porcentaje de infectados aumentó con la edad; no se observó relación con la presencia de eosinofilia. Para *T. canis* no se pudo establecer una tendencia al relacionar el porcentaje de infectados con la edad; eosinofilia igual o mayor a 6% se observó en todos los casos positivos.

Conclusión: se observó una alta incidencia de las infecciones parasitarias estudiadas por lo que correspondería estudiar la presencia de vectores y el grado de contaminación del suelo.

EP52. *Plasmodium vivax*-simil circula en el area malárica meridional de Venezuela. PÉREZ HA, MEDINA JD* BOLÍVAR J, DE LA ROSA M.

Centro de Microbiología; *Centro de Química, Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas, Caracas, Venezuela. hperez@pasteur.ivic.ve

Los esporozoitos de los parásitos *Plasmodium* alcanzan las glándulas salivales del mosquito, circundados por una molécula proteica (CSP) que los acompañará en su tránsito al hospedador vertebrado. Hogaño, la CSP es el centro de una estrategia de vacunación que pretende interferir la esquizogonia exoeritrocítica. La cartografía molecular de la CSP precisa un epitopo **B** dominante, cuyo fenotipo antigénico resulta singular y conservado para cada especie de *Plasmodium*. Sin embargo, en *P. vivax* se presenta un polimorfismo que atañe por lo menos a tres variantes de la CSP. Tipo I y II de distribución global y una tercera, *vivax*-símil restringida a algunas áreas geográficas. Carecemos de indicadores que relacionen este polimorfismo con la epidemiología de la enfermedad, pero tal es relevante a la estrategia de vacunación. Anteriormente hemos demostrado que las variantes I y II de *P. vivax* circulan en una amplia extensión del área endémica venezolana. Los resultados de este trabajo indican la presencia de *vivax*-símil en el sur-este de Venezuela, principalmente en la selva amazónica. El péptido (APGANQEGGAA), émulo del epitopo **B** repetido de la CSP de *vivax*-símil, fue utilizado en un ensayo de ELISA para evaluar anticuerpos específicos en muestras de sueros de individuos expuestos a la transmisión de *P. vivax*. La investigación incluyó una cohorte de Amerindios (Grupo 1, n= 75) de la etnia Guahibo, residentes en el Edo. Amazonas y otra de sujetos mestizos (Grupo 2, n=70), dedicados a la actividad minera en el Edo. Bolívar. El 70% de los individuos del Grupo 1 presentó anticuerpos a *vivax*-símil. En contraste, la frecuencia de respondedores para el Grupo 2 fue 20%. Este estudio ofrece testimonio de la presencia de *vivax*-símil en el sur-este de Venezuela, principalmente en la selva Amazónica. Gravitan sobre este hallazgo interrogantes relacionadas con la génesis de *vivax*-símil en esta parte del mundo, su relación con *Anopheles* sp de la región y posibilidad de un ciclo enzootico en primates no humanos.

EP53. Paludismo en el Hospital F.J.Muñiz: Perfil epidemiológico descriptivo: Período 1982 – 1999.
ORDUNA T, CASTRO VALENCIA J, ABUIN J, LLOVERAS S, ROMANI A, MARTINO O.

Patologías Regionales y Medicina Tropical (CEMPRA-MT), Hospital de Infecciosas F.J.Muñiz, Buenos Aires, Argentina. torduna@intramed.net.ar

Se realizó un análisis retrospectivo de los casos de Paludismo diagnosticados en el Hospital F.J.Muñiz en el período 1982 – 1999. Se registraron 186 casos confirmados por laboratorio parasitológico, de los cuales 116 fueron internados y 70 se asistieron por consultorio externo. En los últimos 5 años se observó un claro aumento en la casuística: 105 casos entre 1995 y 1999 (56,5 % del total), situación antagónica con lo que ocurrió a nivel del registro nacional de casos autóctonos de Paludismo. Analizando la procedencia de nuestros pacientes se evidenció que más del 90 % (169 casos) correspondieron al denominado Paludismo importado, de los cuales el 31 % (53 casos) fueron adquiridos en Bolivia. Respecto de la especie involucrada se identificó *Plasmodium vivax* en 132 casos (70.97 %), *P.falciparum* en 47 (25.27 %), Asociaciones en 4 (2.15 %), no registrándose la especie en 3 enfermos (1.61 %). Los pacientes de nacionalidad argentina representaron el 57 % de los registros (106 casos), seguidos por pacientes de nacionalidad boliviana (22 %, 41 casos) y paraguaya (7 %, 13 casos). El incremento de los viajes al exterior y la posibilidad creciente de la exposición de personas no inmunes

a zonas de Paludismo endémico hace necesario reforzar el nivel de alarma de los profesionales médicos, y considerar en primer lugar a dicha parasitosis ante la presencia de fiebre y el antecedente epidemiológico referido. El Paludismo por la especie *falciparum* debe ser incluido dentro de las emergencias sanitarias y por lo tanto requiere de un diagnóstico precoz y un tratamiento oportuno y eficaz, considerando la posibilidad de resistencia a múltiples drogas según el área de adquisición.

EP54. Estudio epidemiológico descriptivo de la leishmaniosis durante el período 1985-2000.
ORDUNA T, LLOVERAS S, CAGNONI A, ABUIN J, ESPINOSA M, DESSE J, GONZALEZ G, MARTINO O.

Patologías Regionales y Medicina Tropical (CEMPRA-MT), Hospital de Infecciosas F.J.Muñiz, Buenos Aires, Argentina. torduna@intramed.net.ar

Se realizó un análisis retrospectivo de los casos de Leishmaniosis diagnosticados en el Hospital F.J.Muñiz, durante el período 1985 – 2000. Se diagnosticaron 143 casos a través del análisis epidemiológico y del estudio clínico, inmunológico y parasitológico; de los cuales 73 (51%) casos correspondieron a leishmaniosis mucosa, 45 (31%) a la forma tegumentaria y 23 (16%) a la mucocutánea. Solamente 45 (31%) se trataban de una primoinfección leishmaniósica. Predominaron los enfermos de nacionalidad argentina, 88 (61%) de los registros, seguidos por aquellos de nacionalidad paraguaya, 35 (24%) y boliviana, 13 (9%). Al analizar el lugar probable de adquisición se evidenció que 75 (51%) de los pacientes contrajeron la enfermedad en nuestro país, especialmente en las provincias de Santiago del Estero, 26 (34%), Chaco 21 (28%), Misiones 9 (12%) y Salta 8 (10%). La intradermorreacción de Montenegro fue positiva en 120 (83%) pacientes y se realizó diagnóstico histopatológico en 17 (36%) con la forma clínica cutánea y en 44 (59%) y 14 (60%) con la mucosa y mucocutánea, respectivamente. En 9 casos la enfermedad fue adquirida durante viajes a regiones endémicas. El incremento de estas prácticas, obliga a los profesionales médicos al debido entrenamiento para el logro diagnóstico de esta patología. A pesar de ser una enfermedad de denuncia obligatoria, la infección por *Leishmania* es muy poco conocida en nuestro país, aún en las áreas endémicas, motivo por el cual consideramos oportuno realizar el presente estudio epidemiológico con el objetivo de contribuir al mejor conocimiento.

EP55. Control parasitológico en recién nacidos, hijos de madres chagásicas, nacidos en un hospital de la ciudad de Santa Fe, 1999. VIUBLIOMENT L, AMHERT A, NEPOTE M* ACHKAR G*

*Laboratorio de Unidad I, Servicio de Neonatología, Hospital Iturraspe. * Programa. Provincial de Chagas. Bv. Pellegrini 3550. 3000 Santa Fe.*

La provincia de Santa Fe, se encuentra dividida en 8 zonas de salud. Cada zona está compuesta por diferentes áreas programáticas que poseen un hospital base.

El Hospital Iturraspe, es uno de los hospitales de alta complejidad de la Provincia de Santa Fe, está ubicado en la ciudad de Santa Fe, (zona de salud V), con un promedio aproximado de 3000 partos anuales. Entre los años 1997/98 y 99 se logró aumentar la cobertura de control de embarazadas para infección chagásica, llegándose a un 96 % en el año 1999. Según normas provinciales de diagnóstico y

tratamiento de Chagas congénito, los hijos de madre positiva deben ser controlados con métodos parasitológicos (microstrout o microhematocrito), tres controles en los primeros 6 meses de vida. El primer control lo realiza el hospital donde nace y los otros quedan a cargo del centro asistencial al cual pertenece, si todos los controles parasitológicos resultan negativos, se controla el recién nacido a los 6 meses y al año de vida, con dos técnicas serológicas. Al primer resultado positivo, el niño es tratado con antiparasitario específico (Benznidazol, 5 mg/ kg/ durante 30 días, repartido en dos tomas diarias). En el año 1999 se realizaron 3260 partos, con un 96 % de madres controladas. De las madres positivas, fueron controlado el 100 % de los recién nacidos en el primer control, el 46 % en el segundo y el 26 % en el tercero. Considerando todos los microhematocritos realizados, se detectaron 3 niños positivos, lo que equivale al 1,73 %. De los datos obtenidos se concluye que: - es muy importante la realización de todos los controles parasitológicos y serológicos en los recién nacidos, para diagnosticar y tratar los niños positivos. - Se observa una falla en el seguimiento de los hijos de madre chagásica una vez que abandonan el servicio, y por lo tanto se pierde la posibilidad de un diagnóstico precoz; si bien suelen ser hallados por otras estrategias utilizadas en la ciudad.

EP56. Investigación de la enfermedad de Chagas en recién nacidos (RN) hijos de madres con serología positiva. RODRIGUEZ S, FEAS MJ.

Laboratorio de serología. Complejo Sanitario San Luis. Argentina.

Se investigó Chagas congénito(CHC)con el objeto de su detección, tratamiento específico, seguimiento clínico y bioquímico con el fin de disminuir los síntomas de esta patología.

Se emplearon métodos serologicos HAI y ELISA en toda mujer embarazada y a su RN; en el último se emplearon métodos parasitológicos Strout y capilares a los bebés hijos de madres seroreactivas en forma seriada. Periodo 1984-1989 y retomado en 1997-1998. Primer periodo: 1782 muestras; 373 reactivas(20,81%) se siguieron 204 RN; 5 con CHC (2.45%).

Periodo 1997-1998: 958 muestras , 146 reactivas(15,25%) de 41 RN, dos contrajeron CHC(4,8%). Se concluye la importancia de la búsqueda de CHC , dada la prevalencia y la existencia de un tratamiento específico precoz.

EP57. Chagas connatal en la década de los 90, número probables de casos. MURACCIOLE D, RODRIGUEZ C y BASUALDO M.

Depto Bioquímica, Ministerio de Desarrollo Humano. Provincia de Formosa. Argentina. clauamar40@hotmail.com

Se estima el número probable de RN afectados por el *Trypanosoma cruzi* producidos en la última década en la provincia de Formosa, a partir de a) observar los registros de 126.897 Nacidos Vivos entre las Estadísticas Vitales de ese período (Md anual: 12.690) y b) establecer que el 8,67% de esas madres eran chagásica - dato que surge de la información mensual recibida en el Departamento Bioquímica, originada por los laboratorios integrantes de red provincial, al estudiar un total de 22.259 gestantes (Md. Anual: 2.226), encontrando a 1.929 de ellas reactivas las pruebas HAI y ELISA (Md anual: 193). De manera que con un promedio anual de 12.690 gestaciones; el 8,67% (193/2.226) de

seroprevalencia chagásica en las grávidas; una sensibilidad y especificidad cercana al 100% al practicar simultáneamente dos pruebas serológicas, según normas; y con un rango de efectividad teórica de la vía de transmisión connatal entre el 1 y el 10% es probable que, en promedio y por año, entre 11 a 110 de los RN resultaran infectados. Serían unos 110 a 1.100 nuevos casos en el período considerado, los que constituirían la población diana sobre la que habría que enfatizar las acciones de prevención de segundo nivel - supervisión de la detección temprana, diagnóstico y tratamiento de los afectados - que garanticen su curación. Por otro lado, el bajo promedio anual de embarazadas estudiadas: 17,54% (2.226/12.690) que caracteriza la serie - notándose mejoras hacia el final - revelaría un alto grado de pérdida de oportunidades de captación de RN chagásicos y este conocimiento parcializado de la incidencia de la transmisión vertical resulta inconveniente para establecer la probabilidad local de dicha transmisión, por esto para la estimación realizada, se utiliza un corredor consideradamente amplio de valores publicados por otros autores. En conclusión, es primordial implementar estrategias que aseguren el cumplimiento de normas para lograr el control efectivo de la transmisión connatal de chagas en la provincia, a partir de la detección sistemática de la embarazada infectada y el estudio de su fruto

EP58. Chagas en embarazadas en los últimos 5 años. . MURACCIOLE D, BASUALDO MA y RODRIGUEZ C.

Departamento Bioquímica, Ministerio Desarrollo Humano. Provincia de Formosa. Argentina clauamar40@hotmail.com

A partir del año '95 se sistematiza la recolección de la planilla de control laboratorial de Chagas de la Red Pública de Salud, remitida mensualmente desde los niveles locales, al nivel Central del Depto Bioquímica, recomendándose la correcta clasificación y registro del motivo de consulta. Esta acción permite el seguimiento del control serológico de las embarazadas mediante la realización del par de pruebas recomendadas por normas (HAI y ELISA), en los Laboratorios de la Red Provincial. Los datos de total de gestantes, nº de estudiadas, % cobertura, nº de reactivas y prevalencia hallada se transcribe en el siguiente cuadro:

Año	Total Gestantes	Estudiadas	% estudiado	Nº positivas	Preval en emb.
1995	13.143	3.502	26,64	221	6,31
1996	12.819	4.310	33,62	596	13,82
1997	12.209	5.570	45,62	485	8,71
1998	12.239	5.377	43,93	368	6,85
1999	12.446	6.905	55,47	535	7,74
Totales	62.856	25.664	40,82	2.205	8,59

De las embarazadas del periodo 95 - 99 se estudió el 40,82% (25.664/62.856), con un incremento gradual: del 26,64% en el '95 a más del doble, 55,47%, en el '99. Si tenemos en cuenta que la gran mayoría de las embarazadas solo recibe 1 control serológico de chagas y que el promedio provincial de personas con cobertura de obra social es, para el año '99, del 52% podría considerarse como bueno el control laboratorial de la población de embarazadas sin cobertura social en la Provincia de Formosa. La seroprevalencia promedio de la infección chagásica en la población bajo estudio fue del 8,59% (2205/62856), con un pico del 13,82% en el año '96, situación que amerita ser estudiada.

EP59. La endemia chagásica y los controles laboratoriales en los últimos 11 años. MASSI¹ C, MURACCIOLE² D, BASUALDO² M.

Hospital Madre y Niño¹. Dpto Bioquímica². Ministerio De desarrollo Humano. Formosa. Argentina. carlosmassi@arnet.com.ar

En la provincia de Formosa -de extensa superficie territorial, marcada marginación social, baja y desproporcionada distribución de su población, con tasas de analfabetismo y mortalidad infantil superiores al promedio nacional - la tendencia de la endemia chagásica, de 1.989 a 1.999, pudo apreciarse a partir del análisis de los datos compilados en el Departamento Bioquímica, generados en los controles laboratoriales de la Población general (Po), Donantes de Sangre (DS), Embarazadas (E), Recién Nacidos de las infectadas (RN) y Demanda espontánea (DE), practicados según normas, en los 20 integrantes de la red provincial. En general, se destaca que, el número de controles va en aumento y los niveles de afectados, irregular al principio, asciende hacia el final del período. De manera que, en 1.999, se observa: a) una seroprevalencia (SP) de 10,15% en la Po, valor mayor a la cifra Promedio del Período (PP): 7,56%, aún cuando la serie está influida por edad y lugar de residencia de los encuestados, también es posible que este aumento podría estar reflejando inconvenientes en el control de la endemia; b) para DS la SP es de 9,46% mayor a PP:8,32%, estimándose de 14 a 28 los nuevos infectados por esta vía, casos potencialmente evitables si se hubiera examinado el 100% de este universo en los 11 años considerados; c) en las E la SP es de 8,45% similar al PP en este grupo, habiéndose incrementado el nivel de cobertura, se superó el 50% de las controladas; d) los RN presentan importantes diferencias entre las cifras de posibles y los detectados, quizás se deba a presencia de formas inaparentes o a escapes de estos niños a la atención médica y; e) la aparición en la DE de 10 casos de Chagas Agudo en zona en vigilancia entomológica, indicaría presencia de focos de reinfestación. La situación expuesta indicaría, necesariamente, encarar una lucha contra el vector con acciones de vigilancia, renovado ataques e inversiones en : rociados, bancos de sangre, controles de embarazadas, estudios sistematizado de los RN de las infectadas y educación sanitaria para lograr la efectiva participación comunitaria en la prevención y control.

EP60. Estudio Serológico de Impacto en el Control y Vigilancia de la Transmisión de Enfermedad de Chagas, Dpto. Pomán, Catamarca, Argentina, 2000. HERRERA B^{*}, HERRERA L^{**}, SPILLMANN C^{***}.

Servicio Nacional^{}, Servicio Provincial de Chagas Catamarca^{**}, Servicio Nacional de Chagas Córdoba^{***}.*

En el marco del Programa de Control y vigilancia de la transmisión de Chagas por casi 40 años de lucha en la pcia. de Catamarca y en donde a partir de 1995 se implementa una nueva estrategia de Control con participación comunitaria, utilizando tecnología apropiada y considerando la evaluación serológica como método de elección por su sensibilidad y seguridad, se decidió medir el impacto de las acciones ejecutadas por el Programa de Chagas. Se fijaron los siguientes objetivos: 1- Conocer la eficacia del ataque químico y de todas las actividades involucradas en el control de la enfermedad de Chagas. 2- Conocer el grado de transmisión vectorial en niños de cada localidad del Dpto. 3-Con-

firmar infección por *T. cruzi* en las madres de los niños reactivos de 0 a 5 años (Transmisión Congénita) En 1995 se realizó un tamizaje serológico en 2618 niños de 0 a 14 años obteniéndose una prevalencia global de 2,22%, 58 resultaron con infección confirmada a través de suero obtenido por venopunción, todos recibieron tratamiento con benznidazol y actualmente en control post-tratamiento. Dato estadísticamente muy significativo ($X^2 = 448$, $p < 0,0001$) respecto al valor hallado en el estudio de base realizado en el mismo grupo etéreo, al iniciarse la lucha en el Dpto.(1968), de 23,01%. A los fines de evaluar la incorporación de la nueva metodología, se realizó un Estudio Serológico de Impacto, investigándose al 100% de los niños de 0a5 años en Diciembre de 1999, en 13 localidades del Dpto. Se procesaron 1160 muestras de sangre capilar por dos técnicas, HAI y ELISA. La prevalencia global fue de 0,26%, resultando reactivos tres niños de diferentes localidades cuyas madres resultaron chagásicas, confirmadas por venopunción . Conclusión: 1-La serología mostró que las acciones de control y vigilancia fueron eficaces. 2- El estudio serológico de impacto, muestra interrupción de la transmisión vectorial en el Dpto. de Pomán. 3- La incidencia se dio en niños hijos de madre chagásica, Transmisión Congénita. 4- A través del estudio de impacto de detectaron nuevos casos de Chagas para su control y tratamiento médico específico.

EP61. Control de la infección chagásica en embarazadas de la Provincia de Santa Fe, 1997/1998/1999. ACHKAR G, NEPOTE M^{*}.

*Laboratorio Central Blas Parera 8260 * Prog. Provincial de Chagas Bv. Pellegrini 3550-3000 Santa Fe*

La Provincia de Santa Fe, está dividida en 19 departamentos, de los cuales los 7 ubicados al norte son considerados como zona endémica para Chagas, el resto son considerados libres de transmisión vectorial. Sin embargo los procesos migratorios, no solo intraprovinciales, de población infectada desde las áreas endémicas hacia las no endémicas han extendido el problema a toda la Provincia, debido a esto cobran importancia las otras formas de transmisión de la infección, como la connatal. De la información proveniente de los servicios de laboratorio provinciales, en su mayoría públicos y pertenecientes a la Red de Laboratorios de la Provincia, en 1997,1998 y 1999 se obtuvo un 9.8%, 8.8% y 8.2% respectivamente de infección chagásica en muestras de embarazadas que viven en zona endémica, mientras que en el resto de la Provincia se obtuvo un 6%, 5.7% y 6.33%, en un departamento de zona no endémica se obtuvo 0% de infección .En el departamento La Capital (capital de la Provincia y ubicado en zona no endémico) se detectó un 7,80%, 8,27% y 7.33%. El departamento Rosario ubicado al sur de la provincia y de gran importancia económica se obtuvo un 4.75%, 5.16% y 4.65%. El total de muestras analizadas en toda la Provincia en estos tres años, fue de 21256,19973 y 22988 respectivamente arrojando un 7%. 6.57% y 6.33% de madres positivas.

De estos datos puede concluirse que: -La problemática de infección chagásica se extiende a toda la Provincia, por lo tanto deben efectuarse el control a todas las embarazadas y el posterior seguimiento de los hijos de madres positivas para su tratamiento antiparasitario específico en los niños infectados.-La población de madres atendidas en los servicios no es exclusiva de la Provincia por lo tanto no pueden ser utilizados los datos obtenidos como indicadores de impacto de las actividades de control vectorial efectuadas.

EP62. Leishmaniosis y la información. BASUALDO M, MURACCIOLE D y RODRIGUEZ C.

Dpto Bioquímica, Minist Desarrollo Humano. Formosa. Argentina. clamar40@hotmail.com

Se evalúa la confiabilidad del sistema de información sobre la Incidencia anual de Leishmaniosis registrada en la provincia de Formosa, de 1.993 a 1.999, a partir del análisis de los datos (personales, clínicos, epidemiológicos y diagnóstico etiológico) del paciente, suministrado por el nivel local de atención a 3 niveles centrales de agregación (CA) - Deptos Vigilancia Epidemiológica(VE), Bioquímica(B) y Programa de Control(PC)- a través de sus respectivas herramientas (Planillas C₂, L₂ y Fichas epidemiológicas), que son elaboradas y remitidas según indicaciones específicas. El Número de casos denunciados por año a cada (CA) total registrado (que surge del entrecruzamiento de la información) y la cifra de coincidentes figuran en el cuadro.

Año	Prog. Ctr	Vig. Epi	Dpto Bioq.	Total Reg	Coincid.
93	0	4	0	4	0
94	1	3	0	4	0
95	2	2	0	4	0
96	11	9	7	19	2
97	10	7	0	11	0
98	11	18	13	28	3
99	11	11	14	29	1
Total	46	54	34	99	5

Es notorio: a) el aumento de casos en los años '98 (28) y '99(29), b) que el 46% ha sido tratado, 54% notificado a VE y 34% diagnosticado en la Red de Laboratorios (Redlab), más las diferentes situaciones que se presentan a partir de la combinación de estos eventos, y c) un bajo nivel de concordancia entre los datos registrados por los 3 CA -de 99 casos, sólo 5 están debidamente notificados a VE, diagnosticados en la Redlab y tratados bajo supervisión del PC. Detectada las fallas, se realizan las recomendaciones pertinentes a efectos de asegurar la validez de datos, útiles para orientar las intervenciones y motivar estudios epidemiológicos pertinentes.

EP63. Leishmaniosis visceral canina en el area metropolitana de la "Gran Asunción", Paraguay. CANESE A.

Cátedra de Microbiología de la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad Nacional de Asunción, Paraguay. Laboratorio Central de Salud Pública y Programa Nacional de Leishmaniasis del Ministerio de Salud Pública y Bienestar Social del Paraguay.

La Leishmaniasis visceral (LV) es una enfermedad infecciosa, parasitaria, que en América está causada por el protozooario hemoflagelado *Leishmania chagasi*. En Paraguay, después del primer caso encontrado por Migone en 1911, se han reportado 7 casos más de LV humana. Después de 45 años, Kasamatsu en 1995, diagnosticó el penúltimo caso conocido, en un niño proveniente de la ciudad de Villa Elisa, cercana a la ciudad de Asunción. Se procedió al estudio de una muestra representativa y aleatoria de la población de perros de las ciudades de Asunción, Lambaré y San Lorenzo, para determinar la prevalencia de los casos de LV canina, entre noviembre de 1997 y setiembre de 1999. Se realizó la prueba serológica de Inmunofluorescencia indirecta para Leishmaniasis, utilizando como antígenos a formas promastigotes de cultivo de *L. braziliensis*, a las muestras de sangre tomadas de los perros. Se analizaron 448 perros en Asunción, 348 perros en la ciudad de Lambaré y

158 en la ciudad de San Lorenzo. La seroprevalencia para LV canina encontrada fue del 3,1 % para Asunción, del 8,6 % para Lambaré y del 11,8 % para San Lorenzo. El promedio general de prevalencia de las tres ciudades es del 6,6 % (63/955). Es importante tener presente que a raíz de la existencia de una epidemia muy generalizada, de LV canina con altos índices de seroprevalencia en el área metropolitana del "Gran Asunción", de hoy en más no se debe dudar de la posibilidad de ocurrencia de casos de LV humana.

EP64. Red Provincial de Laboratorios Públicos: logros, obstáculos y compromisos. BASUALDO M, RODRIGUEZ C. y MURACCIOLE D.

Dpto Bioquímica, Ministerio de Desarrollo Humano. Provincia de Formosa. Argentina. clamar40@hotmail.com

En el marco legal otorgado por los art. 80 y 81 (adhesión a la estrategia de Atención Primaria) de la Constitución Provincial y la Resolución Ministerial 3773/97 al Sistema de Salud y Subsistemas de apoyo, entre ellos la Red de Laboratorios (redlab), al año 2.000, se logró: 1) La Clasificación en diferentes niveles de complejidad de los 20 integrantes de las 12 Redes temáticas, ya diseñadas e implementadas (TBC, Lepra, Meningitis, Febriles Eruptivas, Hepatitis B, Chagas, Banco de Sangre, Cólera, Retrovirus-ETS-SIDA, Análisis Clínicos). Los que trabajan coordinada y solidariamente, desde la toma de muestra hasta el diagnóstico de mayor especialidad realizado en los Centros de Referencia Regionales o Nacionales, posibilitando así el acceso del demandante al examen laboratorial, cualquiera sea su lugar de residencia; aportando datos fiables a la especificidad del diagnóstico clínico y 2) Participación y presentación, en eventos Nacionales e Internacionales, de estudios sobre patologías virales, parasitarias y bacterianas. No obstante tener que salvar *obstáculos* - como 1) el escaso desarrollo de instancias de reflexión del equipo de salud que garantice el mejoramiento continuo de la calidad del servicio y 2) la visión parcializada del sistema redlab de los efectores locales, por presentaciones individuales y ocasionales de la estrategia de trabajo, imposibilitando la contrapropuesta para mejorarla - se asumen desde el nivel central de la red los siguientes *compromisos* 1) diseñar y poner en funcio-namiento redes diagnósticas de patologías (Toxoplasmosis, Leishmaniasis, Diarrea, Inf. Intrahospitalarias, Listeriosis, Envenenamiento por animal ponzoñoso, Influenza y otras virales) aún no integradas a la presente modalidad y fortalecimiento de las ya existentes y 2) enfatizar la capacitación presencial y en servicio (a través de la supervisión programada y educación a distancia) como estrategia de desarrollo de organizaciones inteligentes, basadas en el aprendizaje continuo y en la pasión por la excelencia, para la mejora sostenida de la calidad del servicio brindado.

EP65. Relevamiento epidemiológico de diarreas agudas en la provincia de Misiones. GRENÓN S, SALVI GRABULOSA M¹, ROGINSKY S², VILLALBA C³, GONZALEZ C⁴

H. Samic Obera⁴, H Samic Eldorado², H. Madariaga Posadas³, H. Pcial. de Pediatría¹. Posadas Misiones. Grenons@correo.unam.edu.ar

A fin de evaluar la etiología de los procesos diarreicos en nuestra provincia se analizaron los resultados de los coprocultivos realizados en el Marco de la Red Provincial de Gastroenteritis entre 1.994 y 1.999. Las materias fecales se recogieron y procesaron según normas estándares para la investigación de: *Salmonella (S) spp*; *Shigella (Sh) spp* .; y *V. cholerae (Vch.)* por cultivo. Por microscopia se realizó la búsqueda de leucocitos y elementos parasitarios. Se reali-

zaron registros de edad, sexo y procedencia de los pacientes. Las cepas aisladas fueron enviadas para su confirmación al INEI- ANLIS MALBRAN. Sobre 18.673 muestras el 95% correspondieron a pacientes pediátricos, siendo el 70% de los mismos ambulatorios. Se detectaron patógenos bacterianos y/o parasitarios en 6.030 casos (32,5%) identificándose: 2.429 cepas de *Sh. flexneri* (80,5%); 422 de *Sh. sonnei* (14%); 165 de *Salmonella spp.* (5,5 %). No se detectó *Vch*. Los serotipos de *Sh. flexneri* aislados en orden de frecuencia fueron: 2, 3, 6, y las serovariedades de *Salmonella* más importantes: Enteritidis, Hadar, Chester, Typhimurium, Zaiman, Heidelberg, Agona y Panama. Las cepas de *Sh. flexneri* aisladas presentaron resistencia a: ampicilina (90%); cloranfenicol (80%); cotrimoxazol (75%), gentamicina y polimixina (9%). Todas fueron sensibles a: furazolidona, quinolonas fluoradas y fosfomicina. *Sh. sonnei* presentó resistencia a: cotrimoxazol 50%, ampicilina 20% y cloranfenicol 9%. No se detectaron cepas de *Salmonella spp.* multiresistentes. En 2.554 casos se observaron elementos parasitarios: 1.046 *Giardia lamblia* (41%), 479 *Strongyloides stercoralis* (19%), 389 *Ascaris lumbricoides* (15%), 211 Uncinarias (8%); 164 *Hymenolepis nana* (6%); 131 *Blastocystis hominis* (5%), y otros. Se detectaron 270 casos de asociaciones de enteropatógenos bacterianos y parasitarios y 188 poliparasitados.

La metodología adoptada permite brindar información epidemiológica de interés.

EP66. *Streptococcus pneumoniae* aislados de infecciones invasivas en pacientes pediátricos. Perfiles de sensibilidad. GRENÓN S, VON SPECHT M.

Carrera de Especialización en Microbiología Clínica. CIDET. FCEQYN. UNaM. Posadas, Misiones. grenons@correo.unam.edu.ar.

Desde su introducción, la penicilina (PEN) y sus derivados han constituido el tratamiento de elección en las infecciones neumocócicas. La incidencia mundial de cepas con distintos grados de resistencia ha aumentado a partir de 1970, haciendo difícil la elección de la terapia empírica para las infecciones invasivas. Con el objeto de determinar los perfiles de susceptibilidad a diferentes antibióticos en cepas de *Streptococcus pneumoniae* (Spn) aisladas de procesos invasivos en el Hospital Provincial de Pediatría (HPP) se encaró el presente trabajo. Las cepas de Spn aisladas fueron tipificadas según metodología *standard*. Las pruebas de sensibilidad por métodos de difusión se efectuaron siguiendo las pautas del NCCLS 1999. Todos los aislamientos fueron enviados para su confirmación al INEI - ANLIS C. Malbrán. Entre Junio de 1998 y Julio de 2000, se estudiaron 80 cepas de Spn aisladas de los siguientes materiales: LCR (18%); LPP (31%); Hemocultivos (47,6%); Otros (2,4%); de pacientes con diagnósticos clínico de neumonía 51, meningitis 14, sépsis 7, otros 10. Los perfiles de sensibilidad detectados fueron: PEN (66%), Rifampicina, RFA (98%), Eritromicina, ERY (92%), Cloranfenicol, CMP (89%), Cotrimoxazol TMS (53%), Tetraciclina, TET (77%) y Ofloxacin OFX (100%). De las cepas referidas, 23 (48%) tuvieron resistencia a por lo menos una de todas las drogas probadas, 4 de estas fueron multiresistentes, presentando resistencia a PEN y a dos o más drogas. Se observó asociación entre resistencia a PEN y resistencia a: TMS ($p=0,004$) y a ERY ($p=0,02$). No hubo asociación entre resistencia a PEN y resistencia a: CMP ($p=0,06$); TET ($p=0,34$); ni RFA ($p=0,37$). El siguiente relevamiento epidemiológico permitirá establecer pautas para tratamientos empíricos en el HPP.

EP67. 14 Años de vigilancia arboviral. RODRIGUEZ C, MURACCIOLE D y BASUALDO M

Dpto Bioquímica, Minist Desarrollo Humano. Formosa. Argentina. clauamar40@hotmail.com

1.986 Alerta sanitaria. El *Aedes aegypti* invade nuevas áreas geográficas. Se suceden epidemias de Dengue (Den) Hemorrágico (Cuba 1981) y Clásico en países limítrofes (Brasil '86, Bolivia '87 y Paraguay '88). Área de mayor riesgo inicial: este Formoseño (factores demográficos, climáticos, accesibilidad a zonas epidémicas, etc.). Se muestrea la población mediante distintas estrategias en búsqueda de marcadores serológicos que evidencien contactos con arbovirus. Las pruebas (ELISA, IHA, NT, Cultivos y PCR) se realizan en diferentes centros, según períodos. En 1.987 se notó que el 9,5% (35/368) portaban Anticuerpos (Ac) contra algún Flavivirus¹. Los siguientes Estudios² detectaron Ac contra virus de a) La Encefalitis Equina Venezolana (EEV) Subtipo VI en febriles, año 1.989, b) EEV Subtipo I y VI, Fiebre Amarilla y Bussuquara en encuestados en los años '90 a '93 y c) La Encefalitis de San Luis (ESL) mostró aumento paulatino de afectados: 10% (22/189), 21% (60/284) y 32% (50/157) en '93, '95 y '97 respectivamente. En 1.999 Muestras derivadas por cuota, de febriles sin etiología, con antecedentes epidemiológicos y residentes en zona urbana, 3 de 6 localidades centinelas, mostraron reactividad a ESL (Screening Provincial y confirmación Nacional³). La ausencia de IgG Den en 250 asintomáticos de Capital indicaría posible inexistencia de circulación viral autóctona en la misma. Se registra Den1 importados en 1.989² (2 casos), en '94 (1) y en '99⁴ (1), 3 en Clorinda y el último en Formosa. Todos mayores de 40 años, provenientes de Paraguay. A semana 29/2.000 número mayor de centinelas referencian sin límites sueros compatibles con Den. Son 208 screening (+) de 598 test. 17 muestran marcadores a Den1 (datos provisionales). La flexibilidad del proceso y las características de los muestreos (por conveniencia) permitieron evidenciar la presencia de diferentes arbovirus en la provincia. La combinación con otros diseños de estudios permitiría avanzar en el conocimiento del fenómeno. Información útil para la implementación de acciones efectivas.

Centros de Diagnóstico Institutos: ¹ Medicina Regional - Resistencia - Chaco. ²Dr JM Vanella"- Córdoba, ³Dr J Maiztegui"- Pergamino y ⁴Dr CG Malbrán"- Bs As

EP68. Dengue y vigilancia de febriles año 1.999. RODRIGUEZ C, MEDINA L, DELGADO S, MURACCIOLE D y BASUALDO M,

Lab. Vig. Epidemiológica, Dpto Bioquímica, Ministerio Desarrollo Humano. Formosa. Argentina clauamar40@hotmail.com

A efectos de detectar tempranamente la introducción del Virus Dengue en la provincia de Formosa y orientar la implementación de las medidas de control, se propone realizar, semanalmente, un total de 37 pruebas screening en el referente provincial y confirmar el diagnóstico en Centros Nacionales, estableciendo cupos por centro Centinela de Capital e Interior, para la toma y envío de muestras de febriles sin etiología - de cualquier edad y residente en zona urbana de la localidad en vigilancia - que demandan atención médica en el mismo. Los cupos semanales, muestras Totales (esperadas y recibidas) y nivel de cumplimiento por centro, habiéndose vigilado 37 semanas (desde la 15 a la 52), en 1999 figuran en el cuadro:

Centinelas	Cupo	Esperado	Recibido	% cumplimiento
Ingeniero Juarez	5	185	33	18
Las Lomitas	5	185	32	17
Est. del Camo	3	111	19	17
Ibarreta	4	148	135	91
Clorinda	10	370	39	10
H. Central	2	74	33	44
H. Madre y Niño	2	74	1	1
Ctro Salud Eva Perón	2	74	2	3
Ctro Salud 2 de Abril	2	74	4	5
Ctro Salud Pablo Bargas	2	74	5	7
Totales	37	1369	303	23

De modo que, aún cuando se alcanzó sólo un 23% de la meta propuesta y los grados de respuestas fueran dispares, se detectó: a) 1 Caso de Dengue¹ importado (Semanas 19, mujer de 40 años, residente en Formosa ciudad Capital y proveniente de Asunción - Paraguay) y b) presencia de anticuerpos contra el virus de la Encefalitis de San Luis (ESL)² en muestras de Las Lomitas, Clorinda e Ibarreta, mostrando la última una seroprevalencia del 12,59% (17/135). Confirmado por los Institutos: ¹"Dr CG Malbrán"- BsAs; ²"Dr J Maiztegui"- Pergamino

PA: PATOGENIA

PA69. Efecto del selenio dietario sobre la infección chagásica experimental. SOLANA¹ ME, LEVANDER O², GOMEZ R¹.

¹Dto Microbiol, Parasitol e Inmunol. F. Med. UBA; ² Hum Nut Res Center, USDA, ARS, Beltsville, MD, USA. parainmu@fmed.uba.ar.

En muchas regiones de Latinoamérica donde la enfermedad de Chagas es endémica, su distribución geográfica coincide con alta prevalencia de desnutrición infantil. El selenio (Se) es un micronutriente esencial en la dieta y un conocido antioxidante celular que neutraliza el daño ejercido por los radicales libres y el stress oxidativo. Estas propiedades son importantes durante la respuesta inmune frente a patógenos ya que los macrófagos y neutrófilos liberan gran cantidad de intermediarios reactivos del oxígeno (ROI). Se ha comunicado alta producción de ROI en ratones con altas parasitemias en fase aguda y con intensa respuesta inflamatoria tisular en fase crónica de la infección por *T. cruzi*. El objetivo de este estudio fue evaluar el papel del Se en la dieta en el curso de la infección de ratones C3H/HeN con la cepa mitotrópica CA-I (clon K98) de *T. cruzi*. Se separaron al azar en 2 grupos: 8 animales recibieron desde el nacimiento una dieta suplementada con Se (Se⁺) y 7 una dieta deficiente en Se (Se⁻). Al mes, fueron inoculados con 5X10⁴ tripomastigotes sanguíneos por vía intraperitoneal. La parasitemia fue registrada desde los 19 días post-infección (dpi) hasta los 75 dpi. Al cabo de este tiempo los animales se sacrificaron y se obtuvieron muestras de músculo isquiotibial, las que se procesaron para su estudio histopatológico. Los resultados mostraron que los animales Se⁺ presentaban parasitemias menores que los Se⁻ ($p < 0.05$) durante la fase ascendente de la curva (18 y 22 dpi). El análisis histopatológico de músculo reveló en los ratones Se⁻ miositis moderada con necrosis de fibra muscular e infiltrados inflamatorios linfomo-nocitarios. Las lesiones halladas en los ratones Se⁻ fueron más intensas mostrando un significativo reemplazo del tejido muscular por fibroso; ésto correlacionaba con el notorio deterioro físico de estos ratones que evidenciaban parálisis en el tren posterior. Estos resultados demuestran que el contenido de selenio dietario influye en el curso de la infección experimental con *T. cruzi*.

PA70. In situ characterization of the myocardial inflammatory infiltrate in 'susceptible' and 'resistant' mouse strains infected with *Trypanosoma cruzi*. SILVA-GONÇALVES AJ, MEUSER MB & PIRMEZ C.

Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brazil.

The main objective of this work was to evaluate the inflammatory response in a *T. cruzi* experimental model. Two inbred mice with different haplotypes, one considered as 'resistant' (C57BL/6 – H-2^b) and the other as 'susceptible' (CBA – H-2^k) were infected with 50 trypomastigotes of *T. cruzi*, Colombian strain. The kinetics of the infection was evaluated through parasitemia, mortality, specific serology, seric levels of nitrite, inflammation and phenotype of the cellular infiltrate in the cardiac tissue, as well as the tissue expression of *T. cruzi* and nitric oxide synthase. The peak of the acute phase occurred between days 30 and 50, characterized by high levels of parasitemia, specific seric antibodies, and NO₂, as well as a heavy tissue parasitism in both mouse strains. Although 60% of the animals were able to survive the acute period, only 27,8% of the C57BL/6 and 11,8% of the CBA mice were alive after 300 days of infection (chronic phase). At this point, parasitemia was not patent and levels of NO₂ were similar to non-infected controls. Both mouse strains showed an intense and progressive inflammatory infiltrate, which was more severe in CBA mice, where it occupied 52.7%±9.3 of the tissue section, contrasting to C57BL/6 mice, which showed a significant less important inflammation (19.4%±12.5). The phenotypic analysis evidenced that CD8⁺ T cells were predominant in both C57BL/6 and CBA mice in examined points. The expression of both *T. cruzi* antigens and iNOS in heart sections peaked in the acute phase and was more intense and frequent in C57BL/6 mice than in CBA mice. By using double immunostaining, iNOS often co-localized with *T. cruzi* antigen. At 300 days of infection, CBA mice showed a lower frequency of iNOS foci associated with a higher expression of *T. cruzi* antigens in heart sections as compared to C57BL/6 mice. Altogether, the results suggest that although nitric oxide appears to be an important factor in the control of the parasitemia and tissue parasitism, it is also possible that the excess of NO within the inflammatory foci, by its cytotoxic effects, could have a role in contributing to the tissue injury.

PA71. Rol de la fosfatasa alcalina tipo placentaria en la interacción *Trypanosoma cruzi* - células Hep2.
SARTORI MJ, LIN S, MEZZANO L, FABRO SP.

Instituto de Biología Celular. Fac. Cs. Médicas (U.N.C.), Córdoba, Argentina. Subsidiado por CONICOR y SECyT. Msartori@cmefcm.uncor.edu

La fosfatasa alcalina placentaria (FAP) es una metaloenzima que se expresa en el sincitiotrofoblasto placentario a partir de las 9 semanas de gestación, y se piensa que está involucrada en el transporte de IgG de la madre al feto, actuando como receptor Fc, hecho también comprobado en la línea celular Hep2, en las cuales se demostró presencia de FA tipo placentario (70 KDa). *In vitro*, el *T. cruzi* induce cambios en la actividad de la FAP en vellosidades cultivadas con el parásito. La FAP, por ser una enzima unida a membrana mediante una molécula de glycosyl-fosfatidyl-inositol, podría estar involucrada en la relación huésped-parásito. Para el estudio de esta interacción, se cocultivaron células Hep2 con tripomastigotes (10^3 par./cél.) en tres grupos: control, Hep2 pretratadas con Fosfolipasa C y Hep2 pretratadas con anticuerpos policlonal para FAP y luego cocultivadas con el *T. cruzi*. A los 90 minutos de cocultivo, las células fueron lavadas y fijadas. La invasión parasitaria fue determinada con anticuerpos para el tripomastigote y con hematoxilina. Se determinó la actividad específica de la FAP en los homogeneizados celulares, observando una disminución en las células cocultivadas con el parásito con respecto a las células control, mientras que las pretratadas con la fosfolipasa y el anticuerpo no dieron actividad. Los mismos resultados se obtuvieron en zimogramas realizados con estos homogeneizados. La actividad de la FAP marcada con técnica histoquímica de Gomori demostró actividad normal de la enzima en la membrana plasmática de las células control, y dentro de vacuolas en aquellas cocultivadas con el *T. cruzi*, coincidiendo estas vacuolas con la presencia positiva del parásito detectada por inmunomarcación y con hematoxilina. La invasión parasitaria se vio disminuida significativamente ($p < 0,05$) en las células con los pretratamientos, con respecto al control, evidenciando así la

PA72. Comportamiento de los receptores β cardiacos en la infección con dos cepas de *Trypanosoma cruzi*.
RIVAROLA H, BUSTAMANTE J, FERNÁNDEZ A, ENDERS J, D'LUCCA DORO G, MONTAMAT E, PAGLINI P.

Cat. Física Biomédica, Cat Química Biol., Universidad Nacional de Cba. ppaglini@mater.fcm.unc.edu.ar

La afinidad y densidad de los receptores β cardiacos son parámetros que se alteran en distinta magnitud de acuerdo a la fase de la infección experimental con *Trypanosoma cruzi* que se analice, habiéndose demostrado que son marcadores tempranos de cardiopatías. El presente trabajo analiza el comportamiento de dichos receptores en ratones infectados con 2 cepas de *T. cruzi*: Tulahuen y otra aislada de un paciente crónico que hemos caracterizado genéticamente como perteneciente al zimodema 12. Se estudió además parasitemia, sobrevida y electrocardiografía. Se utilizaron dos grupos de ratones albino suizos, uno infectado con 50 tripomastigotes de cepa Tulahuen/animal (Gr. Tul) ($n=50$) y el otro con 500 parásitos de la cepa Z12 Argentina/animal (Gr. 12) ($n=50$). La parasitemia y sobrevida se controlaron semanalmente, la electrocardiografía y el estudio de los receptores β cardiacos se realizaron en la

etapa aguda, indeterminada y crónica de la infección. El Gr. Tul presentó una parasitemia mayor al Gr. 12 ($p < 0,01$) negativizándose a los 35 dpi y con una sobrevida del 20% a los 135 dpi; el Gr. 12 se negativizó a los 50 dpi con una sobrevida del 80% a los 135 dpi. Los receptores β cardiacos presentaron en el Gr. Tul los siguientes valores de Kd (afinidad): $5,632 \pm 0,265$; $6,859 \pm 0,205$; $11,208 \pm 0,257$ y de Bmax (densidad): $78,245 \pm 1,672$; $77,282 \pm 0,910$; $53,325 \pm 0,713$, en las etapas aguda, indeterminada y crónica respectivamente. En el Gr. 12 los valores de Kd fueron: $5,715 \pm 0,565$; $6,282 \pm 0,398$; $7,324 \pm 0,193$ y de Bmax: $207,638 \pm 8,156$; $228,125 \pm 6,019$; $184,015 \pm 2,101$ en las mismas etapas ($p < 0,01$ con respecto a Gr. Tul y a los normales). Los valores de Kd y Bmax en ratones no infectados fueron: $3,610 \pm 0,05$ y $71,965 \pm 0,36$. Las alteraciones electrocardiográficas aparecieron desde la fase aguda, siendo las del Gr. 12 de menor importancia. El presente trabajo demuestra que la infección con la cepa Z12 Argentina es menos agresiva lo que permite un aumento de la densidad de los receptores β cardiacos desde el inicio de la infección como mecanismo compensador, lo que determinaría menores alteraciones electrocardiográficas y mayor sobrevida en la fase crónica.

PA73. Rol de las reinfecciones en la evolución de la infección por *Trypanosoma cruzi*.
BUSTAMANTE J, RIVAROLA H, FERNÁNDEZ A, ENDERS J, FRETES R, PALMA J, PAGLINI P

Cat. Física Biomédica, Universidad Nacional de Córdoba. ppaglini@mater.fcm.unc.edu.ar

La miocardiopatía es la característica fundamental de la etapa crónica de la Enfermedad de Chagas. La respuesta del huésped frente a la infección por *T. cruzi* es muy variable haciendo que la sintomatología cardíaca oscile entre la muerte súbita hasta transcurrir por años prácticamente inadvertida. Trabajos previos demostraron que las reinfecciones durante la etapa aguda pueden explicar en parte esta variabilidad. En el presente se analizó el efecto de las reinfecciones en la fase crónica valorando parasitemia, sobrevida, electrocardiografía e histopatología. Para esto se utilizaron 2 grupos de ratones albino suizos ($n=50$) inoculados con 50 tripomastigotes de *T. cruzi*, cepa Tulahuen. La primera reinfección se efectuó a los 12 meses de evolución de la infección y la 2ª a los 10 días de esta última (grupo I). El grupo II no se re infectó. La parasitemia se controló semanalmente hasta los 240 días post-reinfección, la electrocardiografía se realizó antes de la reinfección y 30, 60 y 90 días post-reinfección (pr). El grupo re infectado presentó una parasitemia con un valor máximo de 6800 ± 500 parásitos/ml a los 14 días post 1ª reinfección, negativizándose a partir de los 28 días. En el grupo II la parasitemia fue negativa a partir del mes de haber sido infectados. La sobrevida a los 240 días fue del 45%, valor similar a la del grupo control. Los electrocardiogramas efectuados antes de la reinfección demostraron que el 65% de los ratones presentaron alteraciones, fundamentalmente bloqueos auriculo ventriculares y con el eje eléctrico ubicado a 45° . A los 30, 60 y 90 días pr el 100% mostró anomalías ($p < 0,01$), con predominio de bloqueos auriculo-ventriculares y frecuencias cardiacas de 590 ± 58 valor similar al grupo II. El eje eléctrico a los 30 días pr se ubico a los $13 \pm 9^\circ$ ($p < 0,01$), a los 60 días a $23 \pm 7^\circ$ ($p < 0,01$) y a los 90 días a $47 \pm 10^\circ$. La histopatología del grupo I mostró densos infiltrados inflamatorios, necrosis fibrinosa y necrosis y hialinización de las fibras de ambos ventrículos a los 30, 60

y 90 días. El presente demuestra que las reinfecciones en la etapa crónica modifican significativamente la magnitud del daño miocárdico, lo cual explicaría la variabilidad de la sintomatología cardíaca.

PA74. Sobreexpresión de NCAM en muestras de corazón de pacientes chagásicos y detección en *T. cruzi*. BRICEÑO[‡] L, MOSCA[†] W, SUAREZ[‡] C, MOTA[‡] D, XIONG[†] Y Y PERALTA[‡] A. [‡]

Facultad de Medicina, UCV, Caracas, Venezuela y [†] The Lankenau Institute for Medical Research, Wynnewood, PA, USA. Zoppi88@hotmail.com.

La expresión de NCAM en el corazón de los mamíferos es regulada durante el desarrollo. En la etapa embrional se encuentra sobreexpresada en las células del miocardio. En el corazón adulto su expresión es regulada negativamente, restringiendo su expresión en las células del sistema de conducción. El *Trypanosoma cruzi*, agente causal de la enfermedad de Chagas, induce una miocarditis inflamatoria y bloqueo en el sistema de conducción, causando una severa disfunción cardíaca. Debido a que la expresión de NCAM (Normal Cell Adhesion Molecule) en el corazón adulto, esta restringido a los mismos tejidos que son afectados por la enfermedad de Chagas, postulamos que esta molécula podría estar involucrada en el daño a los tejidos causados por la infección por *T. cruzi*. Empleando técnicas inmunocitoquímica se estudio la expresión de NCAM, en muestras de biopsias de pacientes chagásicos con miocarditis. Los resultados demuestran una sobre-regulación en la expresión de NCAM, tanto en muestras de fase aguda y crónica. Otro hecho resaltante es la expresión de NCAM en los nidos de amastigotes presentes en los tejidos. Sobre la base de estos resultados, se realizaron pruebas de inmunocitoquímica e inmunoblot con las diferentes formas del parásito. Los resultados demuestran que parásitos provenientes de cultivo, como los tripomastigotes de ratones infectados, demuestran la presencia de la molécula en el parásito. Los resultados de inmunoblot, con anticuerpos dirigidos a diferentes porciones de la molécula NCAM, confirman la presencia de NCAM. En conjunto, estos resultados demuestran que la molécula de NCAM se expresa en *T. cruzi*, actuando quizás como receptor para la invasión de células o como inmunomodulador de la respuesta inmune a estos tejidos. Estos hallazgos abren nuevas posibilidades para el entendimiento de la miocarditis chagásica.

PA75. Estudio de la infección por *Trypanosoma cruzi* de las glándulas adrenales en ratones de la cepa Swiss. BARROSO PA, ROMERO NM; OLSEN A; SEGURA MA, BASOMBRÍO MA.

Laboratorio de Patología Experimental, Cs. de la Salud y Cát. Fisiol. Animal, Cs. Naturales. UNSa, Salta. paobar@yupimail.com.

Existen antecedentes que la glándula suprarrenal en humanos, constituye un sitio inmunoprivilegiado en la fase crónica de la enfermedad de Chagas debido a los efectos antiinflamatorios e inmunosupresores locales de los corticoides, determinando la marcada predilección del *Trypanosoma cruzi* por el músculo liso de la vena central suprarrenal, en donde las concentraciones hormonales son elevadas (Teixeira, V y cols. Rev. Soc. Bras. Med. Trop. 24(2):73-78, 1991). Es de especial interés conocer la dinámica de infección por *T. cruzi* en la Glándula Adrenal (GA) del ratón. Por ello planteamos: verificar si existen diferen-

cias significativas en la colonización por *T. cruzi* entre las GA, Músculo Esquelético (ME) y Cardíaco (MC) para la Fase Aguda (FA) y crónica (FC) de la enfermedad. De 28 ratones Swiss, 21 fueron inoculados por vía intraperitoneal con 10⁴ tripomastigotes sanguíneos de la cepa Tulahuén. Los 7 restantes no fueron inoculados (grupo control). Se autopsiaron 3 ratones infectados (con parasitemia positiva) y 1 control, a los 15, 20, 25, 30, 90, 120, 270 días respectivamente después de iniciado el experimento. La coloración empleada fue la de Hematoxilina-Eosina. Se aplicó el modelo del ANOVA. En ratones de la FA se registraron diferencias significativas, entre la densidad de nidos de amastigotes de los distintos órganos (p < 0,0113). El ME con una media de 0.506 nidos/mm² presentó diferencias significativas con respecto a la media registrada para MC (0.183 nidos/mm²) y GA (0.056 nidos/mm²), con un a=0.05. En la FC sólo se registraron nidos de amastigotes en ME con un promedio de 0.090 nidos/mm². Nuestros estudios, nos indican que la GA no constituye un sitio de escape o reservorio en éste modelo. Una posible explicación, sería que la cepa Tulahuén no presenta el tropismo tisular de las halladas en pacientes humanos, por haber sido mantenida por muchas generaciones de pasaje en ratones en fase aguda. Financiado por CIUNSa y CONICET.

PA76. Ensayos en ratones de la infectividad transplacentaria de aislados de *Trypanosoma cruzi* de casos congénitos humanos. MARCO JD, PADILLA AM, DIOSQUE P, MORA MA, BARROSO PA, SANCHEZ NEGRETTE O, RAMOS F, NASSER J Y BASOMBRÍO MA.

Laboratorio de Patología Experimental. Fac. Cs. Salud. Universidad Nac. de Salta. Argentina. marcodiago@hotmail.com

La variedad de formas clínicas de la enfermedad de Chagas se suele atribuir a genotipos particulares de *T. cruzi*. Se ha postulado que un importante factor de Chagas congénito sería la infección con cepas del parásito con especial habilidad para el pasaje transplacentario. Hemos intentado comprobar esta hipótesis. En un modelo murino se estudiaron cinco aislados de casos congénitos humanos, obtenidos mediante cultivo en medio LIT HSP. Cada uno de ellos y la cepa Tulahuén se inocularon en dosis conocidas a ratones Swiss hembra de 1 mes de vida. Se aparearon las hembras en las que se detectó infección. Se estudiaron dos camadas de crías, una en fase aguda y otra en fase crónica mediante Hemocultivo y serología (ELISA con Ag. SAPA). La transmisión congénita ocurrió, con cepa Tulahuén, en 1/44 crías nacidas durante la fase aguda de la madre y en 0/58 de fase crónica. Con los aislados congénitos, las cifras correspondientes (totales de 5 aislados) fueron 0/137 y 0/63. Por lo tanto concluimos que los aislados de *T. cruzi* de casos congénitos humanos no tienen especial infectividad transplacentaria en este sistema murino. Agradecemos a la Residencia de Tocoginecología del Hospital Maternoinfantil de la Ciudad de Salta. Financiado por CIUNSa y FONCYT.

PA77. Penetración y viabilidad del *Trypanosoma cruzi* en cultivos *in vitro* de placentas humanas a término. DÍAZ LUJÁN C, FABRO SPDE, FRETES R.

Ila. Cátedra de Histología y Embriología, Fac. Cs. Médicas, Universidad Nacional Córdoba. Argentina. rfretes@cmefcm.uncor.edu.

Chagas congénito, causado por *Trypanosoma cruzi* tiene una incidencia de 0,5-4%. Trabajos previos de nuestro

laboratorio demuestran que subfracciones de placentas humanas a término alteran viabilidad y ultraestructura de la célula parasitaria. Los objetivos del presente trabajo son: (a) Cuantificar la penetración del parásito en la placenta humana en cultivos de tejidos. (b) Determinar si factores liberados por tejidos placentarios alteran la viabilidad del *T. cruzi*. Para ello: Vellosidades coriónicas de placentas humanas a término en MEM199 se cocultivaron con 1×10^6 Tripomastigotes del *T. cruzi* cepa Tulahuen durante 3, 24 y 72h. Estas vellosidades se procesaron para microscopía óptica. Cortes seriados se colorearon con hematoxilina-eosina, Inmunohistoquímica (suero de ratón chagásico crónico como anticuerpo primario para detectar *T. cruzi*) y coloración de Hoetsch para ADN. La cuantificación se efectuó en video microscopio Zeiss con el software KS200 y la técnica de Kielian y Cohn (1982). Los controles fueron cultivos de placentas sin *T. cruzi* y Parásito sin vellosidades coriónicas. Para objetivo (b): La viabilidad parasitaria se efectuó con azul trypan y test de movilidad en cámara de Neubauer de parásitos provenientes de: (1) los medios de los cocultivos con las vellosidades coriónicas; y (2) Incubaciones de trypomastigotes durante 1 h a 37°C en medios provenientes de cultivos de vellosidades placentarias mantenidas durante 15, 180 y 1440 min. Se encontraron muy escasos nidos de parásitos en las vellosidades placentarias de 24 h, correlativamente con 1,65% de parásitos vivos en los medios de cultivos, con respecto al inóculo inicial. A las 72 h no se observaron nidos de parásitos en el interior de las vellosidades como tampoco parásitos vivos en el medio de cultivo. Se observó un 46,77% de parásitos muertos con respecto al control en el experimento (2), cuando el *T. cruzi* se incubó con medios de cultivos de placentas de 1440 min. Conclusión: una escasa penetración del *T. cruzi* al tejido placentario que se correlaciona con muy baja cantidad de parásitos viables en el medio de cultivo y ausencia de replicación tisular del *T. cruzi*. La baja penetración y ausencia de parásitos viables en el medio, pudiera estar causada por el efecto deletéreo de factores liberados por la placenta según los experimentos para probar objetivo (b). Subsidiado por CONICOR y SECyT (U.N.C.).

PA78. Adhesión "in vivo" del *Trypanosoma evansi* a los eritrocitos murinos. ^{1,2}ROSSI MS, ^{1,3}BOADA-SUCRE A, ³BOHER Y, ⁴RODRIGUEZ P, ^{1,3}DE STEFANO H, ⁴FINOL HJ, ⁴APONTE Y y ⁴BELLO B.¹

Post-grado en Ciencias mención Zoología, Facultad de Ciencias, Universidad Central de Venezuela (U.C.V.).
²Departamento de Ciencias Morfológicas, Escuela José María Vargas, Facultad de Medicina, U.C.V.³IDECYT, Universidad Nacional Experimental Simón Rodríguez (U.N.E.S.R).⁴Centro de Microscopía Electrónica, Facultad de Ciencias, U.C.V. ^{1,2}Tvax@hotmail.com, ^{1,3}alboada@hotmail.com.

En Venezuela el *T. evansi* es el agente causal de la tripanosomiasis equina. La enfermedad se caracteriza por alteraciones tales como necrosis, inflamación, anemia y degeneración. La anemia que desarrollan los equinos obedece a un fenómeno multifactorial con implicaciones inmunológicas, fisiológicas y metabólicas. La adhesión del *T. brucei* a eritrocitos, reticulocitos y plaquetas, del *T. congolense* a eritrocitos y células endoteliales y del *T. evansi* a plaquetas determina alteraciones en las membranas plasmáticas de las células del hospedador, así como un incremento en la susceptibilidad de las mismas a la lisis y fagocitosis. El objetivo de este trabajo es verificar mediante

microscopía electrónica, si las poblaciones venezolanas del *T. evansi* tienen la capacidad de adherirse a los eritrocitos de ratones albinos. Para ello sangre completa (parasitemia de 10^9 trip./ml) fue procesada para la microscopía electrónica de barrido (secado por punto crítico) y transmisión (corte fino y criofractura). Los resultados demuestran la adhesión del *T. evansi* a eritrocitos a través del flagelo y el cuerpo. En algunos casos la adhesión de los tripanosomas ocurre con más de 1 eritrocito y es mediada aparentemente por la emisión de filopodios a partir del cuerpo del parásito y de los eritrocitos. El análisis de las replicas de criofractura revela una asociación muy íntima entre la membrana plasmática del *T. evansi* y de los eritrocitos, así como la presencia de discontinuidades en la membrana plasmática de los glóbulos rojos. Los resultados constituyen la primera evidencia de este fenómeno en las infecciones causadas por *T. evansi* de Venezuela

PA79. Cambios en la composición de residuos sacaridos en las glándulas adrenales y riñón de ratones infectados experimentalmente con *Trypanosoma evansi*.

^{1,2}BOADA-SUCRE A; ^{1,3}ROSSI MS, ^{1,2}DE STEFANO H, ⁴GONZALEZ-ELORRIAGA M Y ⁴SIGALES L.

¹Post-grado en Ciencias mención Zoología, Facultad de Ciencias, Universidad Central de Venezuela (U.C.V.).
²IDECYT, Universidad Nacional Experimental Simón Rodríguez (U.N.E.S.R). ³Departamento de Ciencias Morfológicas, Escuela José María Vargas, Facultad de Medicina, U.C.V. ⁴Centro de Microscopía Electrónica, Facultad de Ciencias, U.C.V. ^{1,2}alboada@hotmail.com, ^{1,3}Tvax@hotmail.com.

T. evansi causa la tripanosomiasis equina en Venezuela. La misma se caracteriza por anemia y procesos inflamatorios, necróticos y degenerativos. Los tripanosomas secretan enzimas hidrolíticas que tienen como blanco los tejidos del hospedador. Las modificaciones de los receptores para lectinas en las glándulas adrenales y riñones de ratones albinos infectados experimentalmente con *T. evansi* son estudiadas. Las adrenales y trozos del riñón se procesaron por técnicas histológicas convencionales y los cortes histológicos se colorearon con 7 lectinas (sConA, sWGA, SBA, PNA, LFA, SNA y MAA) por el método del ABC. Los resultados demuestran una disminución de los receptores para sConA y PNA, un aumento de los receptores para sWGA y ningún cambio en los receptores para SBA y LFA en los eritrocitos de animales infectados. Los estratos corticales de las adrenales tienen más reacción con la LFA y SNA, a la vez que la medula muestra mayor enlazamiento de SNA y disminución del marcaje con MAA. En el riñón de animales infectados, se presentó aumento del marcaje de la porción delgada del asa de Henle con SNA y de los componentes de la matriz extracelular con UEA-I y disminución del marcaje con SNA en los túbulos contorneados proximales y con PNA y sWGA en la cápsula renal. La infección por *T. evansi* produce cambios complejos en el patrón de glicoconjugados tisulares.

PA80. Alteraciones en la ultraestructura del riñón de ratones infectados experimentalmente con un aislado venezolano de *Trypanosoma evansi*. BOADA-SUCRE A¹, ROSSI MS², DE STEFANO H¹, HERNANDEZ G³ y FINOL HJ⁴.

¹Instituto de Investigaciones Científicas y Tecnológicas (IDECYT-USR) ² Escuela de Medicina, Hospital Vargas. Universidad Central de Venezuela. ³Instituto de Investi-

gaciones en Biomedicina y Ciencias Aplicadas. Universidad de Oriente (IIBCA-UDO). ⁴Centro de Microscopía Electrónica, Universidad Central de Venezuela (CME-UCV).). aboada@unesr.edu.ve

Trypanosoma evansi es el agente etiológico de la tripanosomiasis equina en Venezuela. La misma se manifiesta con un incremento en la temperatura corporal, anemia y debilidad, conduciendo finalmente a la muerte del animal. Los tripanosomas vivos o muertos producen numerosas sustancias con actividad biológica como neuraminidasas, proteasas y lipasas que lesionan las células endoteliales, glóbulos rojos y células de la corteza adrenal. El propósito del presente trabajo fue determinar posibles alteraciones morfológicas en la ultraestructura del riñón de ratones infectados experimentalmente con un aislado venezolano de *Trypanosoma evansi*, para ello un grupo de 6 ratones machos: 2 controles y 4 infectados con 500 tripomastigotes/g aislados de chigüires (*Hydrochoerus hydrochaeris*), fueron sacrificados en la etapa terminal de la infección cuando la parasitemia alcanzó un valor de 10^9 tripanosomas/ml, las muestras tomadas del riñón se procesaron por las técnicas convencionales de la microscopía electrónica de transmisión. Se observó la presencia del parásito en los capilares intraglomerulares, voluminosas proyecciones globulares del endotelio capilar hacia la luz del mismo, infiltrado polimorfonuclear y alteraciones en células de los túbulos contorneados proximales. Estos resultados nos sugieren probablemente, que las sustancias biológicamente activas secretadas en el torrente sanguíneo por la presencia de este flagelado alteran de manera directa o indirecta la ultraestructura celular renal de los murinos.

PA81. *Leishmania (Leishmania) amazonensis*: differences in the *in vitro* behaviour among isolates from distinct clinical presentations of human cutaneous leishmaniasis. GOMES, C.M.C.^{1,4}, MATTA, VLR¹, OLIVEIRA, FTC¹, SILVEIRA, FT², MONTEIRO, HP³, OLIVEIRA, CJ³, COSTA, JM⁴ & CORBETT, CEP¹

¹Dpto de Patología – FMUSP, São Paulo, SP, Brasil. ²Instituto Evandro Chagas-PA, ³Fundação Pró-sangue/Hemocentro São Paulo, ⁴Dpto de Patología da UFMA. gomescla@usp.br

Leishmania (L.) amazonensis causes wide spectrum of disease in humans, and is the unique ethiological agent of anergic diffuse cutaneous leishmaniasis (DCL) in Brazil. Genetic and immunological host background were ascribed as the primary causes in determining the different clinical forms of disease. Nevertheless, the parasite could be involved (Leon et al., 1992; Almeida et al., 1996; Martiny et al., 1999). This study aims to evaluate the behavior of *L. (L.) amazonensis* strains, isolated from patients with different clinical presentation of Tegumentar Leishmaniasis, in the *in vitro* infection of mice peritoneal macrophages. The *L. (L.) amazonensis* strains were isolated from 2 cases of localized cutaneous leishmaniasis (CL), 2 cases of borderline disseminated cutaneous leishmaniasis (BCL) and 3 cases of DCL. 1×10^5 BALB/c peritoneal macrophages were infected with *L. (L.) amazonensis*, stationary culture phase, at a cell ratio of 4 parasites/macrophage and the culture was kept at 35°C with 5% CO₂. After 24 h, the coverslips were stained with Giemsa and the infection index was determined. The nitric oxide (nitrite) concentration was measured in the culture supernatant by the Griess method. The infection index by *L. (L.) amazonensis* isolated from DCL patients was significantly higher (190) compared to CL patients (46). On

the other hand, the infection index by *L. (L.) amazonensis* from BCL cases showed intermediated values (115). The evaluation of nitric oxide production using isolates from different clinical cutaneous presentations demonstrated that NO levels were inversely associated to the parasitism grade of macrophages. In conclusion, our results demonstrated important role of the parasite in determining the parasitism grade and macrophage activation level. Therefore, it is possible that differences among various isolates of the same specie, not detectable by the current taxonomy, may influence the different clinical manifestations besides the genetic and immunological host background. Supported by LIM-50 FMUSP

PA82. The evolution of *L. (L.) amazonensis* infection at the presence of *Lutzomyia longipalpis* salivary gland in resistant mice. LAURENTI MD¹ MATTA VLR; MARQUES V; SECUNDINO, NFC.; PIMENTA PFP; CORBETT CEP.

¹Laboratório de Patologia de Moléstias Infecciosas (LIM-50) do Depto. Patologia da FMUSP, São Paulo, Brazil & ²Laboratório de Entomologia Médica, Centro de Pesquisa René Rachou – CPqRR, Fundação Oswaldo Cruz - FIOCRUZ, Belo Horizonte (MG) Brasil, mdl Lauren@usp.br.

In order to study the effect of *Lutzomyia longipalpis* salivary glands lysate on the evolution of *L. (L.) amazonensis* in resistant mice, C57BL/6 mice were inoculated subcutaneously with 5×10^6 promastigotes, in stationary phase of culture growth, together with lysate of half salivary gland. Control animals were inoculated only with parasites. The hind footpads swelling was measured at 60th day of infection and the histopathology of the parasite subcutaneous inoculation site was characterized at 3, 24, 72 hours and 60 days of infection. Significant increase in the lesion size was observed at 60 days of infection in mice inoculated with the parasite together with salivary gland lysate compared with the controls. The histopathology did not show significant differences between the groups concerning to the inflammatory infiltrate at the beginning of the infection. It was characterized by predominant polymorphonuclear neutrophils (PMN) infiltrate at 3 hours, mixed PMN and mononuclear (MO) cells infiltrate at 24 hours and a predominant MO infiltrate with few eosinophils at 72 hours of infection. In the early period of the infection, the parasitism was slightly higher in the lesion when animals were inoculated only with the parasite. At the 60th day of infection intense vacuolized macrophage infiltration in the dermis with many parasites, few eosinophils and small areas of necrosis were found in the animals inoculated with the parasites together with salivary glands. Animals inoculated with parasites only showed intense mononuclear infiltration with few vacuolized macrophages and moderate parasitism. The presence of eosinophils and necrosis were more intense in this group.

Our preliminary results showed that the salivary glands lysate of *Lutzomyia longipalpis* exacerbates the *L. (L.) amazonensis* infection in C57BL/6 mice, specially in the chronic phase of the disease. Supported by LIM-50 HC-FMUSP.

PA83. Cepas de *Leishmania spp.* mantenidas en hamster (*Mesocricetus auratus*). ROSA JR, BORDA CE, REA MJF

Centro Nacional de Parasitología y Enfermedades Tropicales, Facultad de Medicina, UNNE, Corrientes, Argentina cborda@med.unne.edu.ar

La leishmaniasis cutánea y mucocutánea es endémica en la región nordeste de la Argentina, pero no existen antecedentes sobre la evolución de la infección en hamsters a partir de cepas aisladas en la región.

En mayo de 1998 ocurrió un brote de leishmaniasis en la zona rural de Bella Vista (Corrientes) en dos familias, en una de ellas con cuatro casos de las formas: ulcerosa (1), ulceronodular (2), verrucosa (1) y en la otra familia una ulceronodular. Su etiología se comprobó por la presencia de amastigotes (Giemsa) y promastigotes (NNN) y la reactividad del test de Montenegro. Por cada paciente fueron inoculados dos hamsters, con edades promedio de cinco meses y 190g de peso. Se inoculó 0,1ml del macerado salino de tejido de la lesión en el hocico y el dorso del tarso posterior derecho. La observación de los diez animales fue semanal hasta los 18 meses y se los alimentó con pellets (Cargill) y agua ad libitum. Se buscó el parásito por frotis por aposición de las lesiones y de las vísceras. Solo desarrollaron la infección las formas ulcerosas y ulceronodulares. Los signos que aparecieron de la ulcerosa fueron nódulos y alopecias en los tarsos con un período de incubación entre 36 y 54 días. En la ulceronodular las lesiones aparecieron en tarsos y hocico con un período de incubación muy variable, entre 29 y 37 días en el hocico y en los tarsos a los 20, 162 y 354 días. Se realizó una subinoculación en la ulcerosa y cuatro en la ulceronodular. Los periodos de incubación se acortaron, en la ulcerosa a 26 días y 48 días cuando se inoculó en los tarsos y en el hocico, respectivamente. En la ulceronodular entre 10 y 40 días con material inoculado en los tarsos, y en 17 a 53 días en el hocico. En un hamster con una infección inicial que duró 354 días, en la subinoculación el período de incubación descendió a 185 días (tarso). Presentamos esta experiencia en el mantenimiento de *Leishmania sp* en el *Mesocricetus auratus* en el laboratorio por la posibilidad de realizar xenodiagnóstico y facilitar los estudios bioquímicos para tipificar las especies.

PA84. Determination of insulin-like growth factor (IGF)-I levels in children with American Visceral Leishmaniasis from an endemic area of São Luís-MA, Brazil. GOMES CMC¹, MATTA, VLR¹., CALDAS AJM, COSTA JMC, GAMA ME, GIANELLA NETTO D & CORBETT CEP.

¹Departamento de Patologia – FMUSP, São Paulo, SP, Brasil. ²Departamento de Patologia da UFMA, Departamento de Endocrinologia- FMUSP. gomescla@usp.br

Insulin-like growth factor (IGF)-I is an evolutionary well-conserved polypeptide of 7.5 kDa. Functionally, IGF-I is an important endocrine growth and differentiation factor in inflammation and immune activation. Most cell types have ability to produce IGF-I although the main site of production is the liver. This factor is detectable in circulation and tissues either in the soluble form or associated to IGF-I binding proteins. Previous studies have demonstrated that IGF-I induces both *Leishmania* promastigotes and amastigote in vitro proliferation (Gomes et al., 1997, Acta Tropica 64:225-8; Gomes et al. 1998, J. Euk. Microbiol. 45:352-5). Moreover, in vivo studies showed that IGF-I increases the phagocytosis, the number of intracellular parasites and the lesion size in mice infected with *L.(L.) amazonensis* (Goto et al. 1998, Proc. Natl. Acad. Sci.USA 95:13211-16). The present study aims to determine the serum levels of total IGF-I in children with American Visceral Leishmaniasis (AVL). The serum levels were determined by immunoradiometric assay (IRMA) in 29 children (0 to 5 years old) from an endemic area of São Luís –MA. Serum samples were collected from 14 active AVL, 10 infected with *L.(L.) chagasi* and 5 healthy children. They were classified as eutrophic or dystrophic according to anthropometric parameters (Z-score, EPI-INFO). AVL patients and children infected with *L.(L.) chagasi* showed low values of total IGF-I serum level. Healthy children from the same endemic area showed low serum levels of IGF-I compared to References values. Malnutrition induces low level of IGF-I. All children from AVL and infected group presented moderate or severe malnutrition.

The preliminary results showed that total IGF-I serum levels were similar among the different group studied (Kruskall-Wallis, $p > 0.05$). The AVL group with moderate to severe malnutrition showed slight increase in the IGF-I serum levels. This finding may be explained by possible increase in the IGF-I production due to mononuclear phagocytic system activation in liver and spleen induced by *L.(L.) chagasi* infection in the active form of the disease.

Supported by: LIM/50, FAPESP

CLI: CLÍNICA

CLI85. Factores de riesgo y su relación con la cardiopatía chagásica: Estudio piloto. ALMEIDA C, CASTILLO S, ARIAS E, STREIGER M.

CIEN.Fac. Bioqca. y Cs. Biológicas. UNL. Santa Fe, Argentina. streiger@fbc.unl.edu.ar

Un estudio previo mostró diferentes frecuencias de alteraciones electrocardiográficas en infectados chagásicos, según regiones. No se ha dilucidado aún por qué algunos infectados enferman. Se conoce la relación de riesgo de cardiopatía con tipo de alimentación, obesidad, tabaquismo, sedentarismo, estrés y alcoholismo. La ingesta de pescado (ácidos grasos poliinsaturados) puede actuar como factor de protección. Objetivo: estudiar si se presenta relación entre algunos factores de riesgo de cardiopatía y la miocardiopatía chagásica. Para ello se realizó un estudio piloto en población residente en la provincia de Santa Fe (la mayoría en la ciudad de Santa Fe) con serología positiva para Chagas y edades comprendidas entre 22 y 65 años (n=41). G1: 20

infectados asintomáticos, grupo control. G2: 21 pacientes infectados crónicos sintomáticos con alteraciones electrocardiográficas (ECG), sugestivas de miocardiopatía chagásica. Se realizó encuesta alimentaria, y de talla, peso, actividad física, hábitos y antecedentes epidemiológicos. Se registraron tipo, cantidad y frecuencia de alimentos ingeridos semanalmente (recordatorio). Se desglosaron los constituyentes de los alimentos en hidratos de carbono, lípidos y proteínas, y se calcularon las kcal. totales ingeridas por cada individuo. Los resultados obtenidos, con las implicancias que un estudio de este tipo conlleva (parámetros subjetivos y variables en el tiempo), muestran que: 1) Ambos grupos están excedidos en kcal. totales/día y sus dietas son normoproteicas. El tipo de alimentación no presentó diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,05$) entre los grupos. 2) En el G2 se presentan algunos factores de riesgo más acentuados respecto del G1: Obesidad, hábito de fumar, consumo de alcohol, menor actividad física y menor ingesta de pescado. En la población estudiada no se obser-

va asociación entre miocardiopatía chagásica y factor de riesgo alimentario.

CLI86 Estudio de la mortalidad en la evolución de la Enfermedad de Chagas: Evaluación del tratamiento antiparasitario específico y de la terapéutica con Enalapril. GALLERANO R, SOSA R, FELTES G, LIBERTI V.

Servicio de Clínica Médica del H. Córdoba.. Argentina.

Se registraron un total de 44 fallecimientos en 78.8 meses de seguimiento (3.65%), de promedio de edad de 60 años (+/- 12.1 años), sin prevalencia de sexo. El 40% con antecedentes familiares de M.S. El 60% presentó signos o síntomas de insuficiencia cardiaca y el 79% arritmia del pulso. El ECG era anormal en el 95% de los pacientes y el 80% presentaba Cardiomegalia Radiológica. Clasificados como Infectados 2; Cardiópatas Leves 7; Cardiópatas Moderados 13 y Cardiópatas Severos los 22 restantes (4.5%, 15.9%, 29.5% y 50% respectivamente). Se evidenció Progresión de la Cardiopatía en el 73% de los casos y Complicaciones Evolutivas en el 86%. Recibían medicación para la I.C. el 66% de los pacientes y Antiarrítmicos el 19%. Se atribuyeron a la Enfermedad de Chagas 33 de las 44 muertes (75%), y a otras causas el restante 25%. De las muertes atribuibles, el 34% correspondieron a I.C.C. Descompensada, el 23% a I.C.C. junto a otra patología agravante, el 16% a Muerte Súbita y el 2% a otras causas.. La Mortalidad se comprobó en 37 de los «No Tratados» y en 7 de los «Tratados», (5.5% y 1.3%), . (P = 0.00019"). La Mortalidad Atribuible en pacientes mayores de 40 años (449 de los 1203 pacientes) se vió incrementada en forma progresiva con el grado de cardiopatía: 0% en infectados, 3.4% en C. Leves, 13.8% en C. Moderada y 33% en C. Severa; también en los que se evidenció progresión de la Cardiopatía; y se vió disminuida en pacientes que recibieron tratamiento antiparasitario específico y en los cardiópatas con cardiomegalia radiológica que recibieron enalapril en dosis máximas tolerables. Se concluye que la Mortalidad en la Enfermedad de Chagas está asociada con la edad y el grado de Cardiopatía preexistente y un modo de evitar la progresión del daño y sus consecuencias de morbimortalidad, es realizar el tratamiento antiparasitario específico, que cuando es eficaz, detiene o enlentece el curso de la enfermedad. En la Miocardiopatía Moderada y Severa se observa una disminución de los índices de internación anual por I.C. y de Mortalidad por I.C. y por Arritmias, en los pacientes tratados con Enalapril a dosis máximas tolerables, con una considerable disminución del riesgo relativo de sufrir M.S.

CLI88. La autonomía del paciente en la base del consentimiento informado (CI). RISSECH E.

Instituto Nacional de Parasitología Dr Mario Fatała Chaben/CONICET, Buenos Aires, Argentina. rissech@yahoo.com

El CI en la investigación clínica es la práctica del modelo de autonomía que definimos como el respeto a la decisión del paciente tomada en base a la información fidedigna del proceso que va a atravesar. En su decisión intervienen factores sociales, culturales y psicológicos. En la práctica médica este principio puede entrar en colisión con el modelo de beneficencia -proveer el mayor beneficio al paciente desde el punto de vista del médico. La resolución de este conflicto rara vez es sencilla. El respeto a la autonomía del

paciente es el resultado de un largo desarrollo histórico. En los últimos 50 años se han elaborado varios códigos internacionales para garantizarlo. La evaluación del CI se hace en el marco del proyecto "Tratamiento etiológico de la enfermedad de Chagas crónica. Su rol en la evolución de la enfermedad", ensayo clínico randomizado en adultos en diferentes estadios que se realiza en el INP. La explicación clara de los alcances del proyecto en términos de los beneficios, riesgos y molestias para el paciente resulta siempre en la pérdida de sujetos dispuestos a aceptar el ingreso al protocolo. En el proyecto, sobre 474 pacientes ingresados (al 20-7-00), el 11% de los mismos no se presentó a retirar el medicamento luego de la primera explicación de los pasos a cumplir. Esto se debe principalmente, a la posibilidad de tomar placebo, a la duración y número de los controles así como los riesgos y dificultades que esto puede significar para las situaciones laborales. Esta pérdida de pacientes no debe considerarse un fracaso de la convocatoria sino un resultado de la decisión autonoma del paciente. Creemos que el acto del CI debe constituir un dialogo que posibilite la decisión autónoma del paciente a partir de la información médica.

CLI89. Perfil clínico y laboratorial de la enfermedad de Chagas aguda en un grupo de pacientes de zona rural en Santiago del Estero. BARBIERI GP, ALCORTA DE BRIZ M, RAMÍREZ T, LOZA DE SUAREZ L, MORAN DE PARADELO L. MANZUR R.

Centro de Enfermedad de Chagas "Dr.Humberto Lugones".Santiago del Estero (CEChHLSE), Argentina gparbarieri@arnet.com.ar.

Introducción: Desde los primeros trabajos publicados de fase aguda de la Enfermedad y los aportes realizados por Lugones-Ledesma, se ha insistido en la necesidad de pensar en la etiología Chagásica en área endémica de trabajo. La fase aguda es inaparente en un 90 a 95 % y conocer esto y su frecuencia de presentación es fundamental, tanto en la clínica como en la epidemiología del Chagas. ¿En los comienzos del nuevo milenio las manifestaciones clínicas son similares las que describieron en su etapa inicial de la Enfermedad ?*Objetivos:* Establecer el perfil clínico y laboratorial de Chagas agudo en los últimos 5 años en la provincia de Santiago del Estero. *Material y Métodos:* Diseño retrospectivo, longitudinal, experimental de pacientes (p.) que ingresaron en CEChHLSE con criterio de inclusión: Chagas Agudo, por estudios parasitológicos (gota fresca, Strout, microhematocrito y Xenodiagnóstico), recibiendo tratamiento con Benznidazol durante 30 días, a razón de 5 mg/Kg/día, desde 95 a 2000. *Resultados:* Ptes. ingresados 21, con edad promedio de 5,65±5,26 años (0,11-17); viviendas tipo rancho 18 p. (86 %) y de material 3 p. (14 %). Formas de Presentación: a) Con Puerta de Entrada Aparente: Complejo Oftalmo Ganglionar 90 % , b) Sin Puerta de Entrada Aparente: edematosa 5 %, Lipochagoma 5 %, Dias de evolución: 10,20±4,67 días (5-20). Presentaron síntomas: fiebre, 16 p. (76 %), adenopatías, 15 p. (71 %); hepatomegalias, 4 p. (19 %). Evolucion fue: Benigna 95 % y grave 5 % (miocarditis). Laboratorio: Parasitológicos, Strout + 20 p. (95 %). ECG normal: 16 p. (76 %), alteraciones leves, 2 p. (10 %) y severas 1 p. (5 %). Rx Torax: normal 18 p. (86 %). Controles postratamiento: a) parasitológicos con resultados: negativo 21 p. (100 %). Tolerancia buena, 19 p. (95 %) y regular 1 p. (5 %) *Conclusiones:* El perfil clínico fue similar al descrito en etapas iniciales, salvo disminución en incidencia de hepatomegalia.

CLI90. Serological evaluation and follow up of pregnant with risk of transmission of congenital toxoplasmosis in region of Rio Grande do Sul, Brazil. SPALDING SM, RIBEIRO LC, NUMARON, KLEIN C, AMENDEIRA MRR.

LACEN, Hospital Santo Antonio -RS e Instituto Oswaldo Cruz-FioCruz, Brasil. spalding59@hotmail.com.

Congenital toxoplasmosis is contracted through intra-uterine transmission of *T.gondii* to the fetus during pregnancy primo-infection. We realized serological screening and risk factors evaluation for the transmission of *Toxoplasma* in 2.126 pregnant women cared for at SUS day-care clinics of region of the State of RS, Brazil. Of all the assessed pregnant women, 74.5% were reactive to toxoplasmosis, and 3.6% showed IgM seropositivity. From among potential exposure factors from *T.gondii* infection verified their association with the presence of specific antibodies (IgG). Women with IgM reactive as well as their babies were subjects of a prospective study, through serology and parasite isolation attempt. As for pregnant women, IgA and IgG avidity levels were checked for correct identification of the infection period. When the biological materials were tested, total blood and placenta, by use of immunoperoxidase, mice inoculation and of molecular biology all samples were negative. Eye lesions were detected during clinical examination of ten pregnant women. From among the 51 children followed up, 3 had congenital toxoplasmosis and one presented eye lesions and brain calcification.

CLI91. Seguimiento serológico en paciente chagásico con trasplante de médula ósea. SCIARRATA P, VASCONI MD, PONCE DE LEON, ZDERO M.

Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas. Area Parasitología. Area Serología. Rosario. Argentina. zdero@cidoc-unr.com.ar.

El *Trypanosoma cruzi* induce en el huésped una vigorosa y compleja respuesta inmune. Con el advenimiento de los trasplantes de órganos se ha incorporado una nueva posibilidad de adquirir o reactivar una enfermedad latente por la inmunodepresión farmacológica establecida lo que puede modificar la relación huésped-parásito dando origen a manifestaciones clínicas nuevas y más graves. El objetivo de este trabajo fue evaluar la evolución de los anticuerpos anti *Trypanosoma cruzi* (Ac.a.T.c) en un paciente con leucemia mieloide crónica (LMC) y enfermedad de Chagas que fue sometido a un trasplante de médula ósea. Se estudió un paciente masculino de 42 años chagásico con LMC que comenzó a ser tratado con drogas inmunosupresoras una semana previa al trasplante. El seguimiento de los Ac.a.T.c. se realizó por las técnicas de Hemoaglutinación indirecta, ELISA e Inmunofluorescencia indirecta, siendo ejecutadas las tres en forma cuantitativa. El control serológico fue determinado semanalmente durante 7 meses y un último dosaje al año del trasplante. El nivel de Ac determinado por las 3 técnicas mostró variaciones durante el período estudiado. Los títulos observados fueron: HAI de 1/64 a 1/8, ELISA desde 16 diluciones hasta suero puro y en IFI osciló de 300 a 120. En las 3 metodologías empleadas los niveles de Ac se mantuvieron superiores a la taza de corte en esta enfermedad. El presente estudio mostró que la serología para Chagas no se negativizó, a pesar de la inmunosupresión impuesta al paciente y la variación de Ac no provocó una reactivación de su infección crónica evitando así un compromiso neurológico u otras complicaciones fatales.

CLI92. Evolución de la enfermedad de Chagas (ECH) en pacientes inmunosuprimidos por trasplante hepático (TH). LUNA C*, NAGEL C+, BARCAN LA°, SINAGRA A*, DE RISSIO AM*, MARTIN GARCIA M*, RIARTE A*.

*Instituto Nac de Parasitología Dr .M.F. Chabén.+Fundación Favalaro. °Hospital Italiano. Buenos Aires, Argentina.

Se presenta la evolución de 9 pacientes (P) a quienes se les efectuó TH por insuficiencia hepática terminal. El criterio de inclusión en el protocolo de ECH fue la serología reactiva (por lo menos 2/3 tests +), en el receptor y/o en el donante. Ocho de 9 P fueron receptores chagásicos y 1/9 receptor -/donante +. La prevalencia de la ECH en la población de candidatos adultos a TH fue de 3.4% en ambos centros de referencia. Ocho P cursaban la fase indeterminada y 1P la fase crónica inicial de la ECH. El esquema inmunosupresor, siempre asociado a prednisona fue: ciclosporina/micofenolato:7P; ciclosporina/azatioprina:1P; tacrolimus/ micofenolato:1P. Cinco P con rechazo diagnosticado por biopsia, respondieron a pulsos de esteroides. Ningún receptor chagásico mostró parasitemia detectable por Strout ni signos o síntomas de reactivación clínica de la ECH. Un P falleció a los 18 meses por recidiva del hepatocarcinoma. Los 7P restantes continuaban con función normal del implante a los 25 meses (rango 4-40) de seguimiento. La serología permaneció estable durante todo el seguimiento. El receptor no reactivo positivizó el test de ELISA a los días 69 y 76 post TH, y al día 83 se diagnosticó transmisión de la ECH por el injerto, por test de Strout y conversión serológica por ELISA e IFI, sin manifestaciones clínicas. Se administró benznidazol a la dosis de 5mg/ kg/día durante 60 días. La parasitemia se negativizó al día 94, mientras que la serología evolucionó con títulos bajos y/o discordantes, negativizándose definitivamente al día 193. En su evolución este P no presentó evidencias parasitológica, serológica o clínica de haber desarrollado infección aguda por ECH. No hubo reactivación de la ECH en los receptores chagásicos sometidos a diferente régimen inmunosupresor. La transmisión de la infección por *T.cruzi* a receptores seronegativos es una situación clínica controvertida. La prevalencia de la ECH en América Latina, la limitada oferta de órganos y la mortalidad en lista de espera, enfrenta al médico al dilema de trasplantar órganos de donantes seropositivos para ECH.

CLI93. Leishmaniosis versus VIH+. ZDERO M, DEL FRADE A, CAPELLO S, DIEZ S.

Area Infectología. Facultad de Ciencias Médicas. Area Parasitología. Facultad de Ciencias Bioquímicas.UNR. Hospital Provincial del Centenario. Rosario. Argentina. Zdero@cidoc-unr.com.ar.

El género *Leishmania* es un protozooario intracelular capaz de desarrollar lesiones cutáneas, mucocutáneas o viscerales, dependiendo estas interacciones de la relación huésped-parásito, además de considerar el criterio actual de incluir el género *Leishmania* como un agente oportunista emergente en pacientes VIH+. El objetivo fue realizar un diagnóstico precoz a los fines de instaurar un tratamiento específico y evitar la progresión hacia formas más agresivas. Paciente VIH+, de 44 años, varón, heterosexual, de 20 años de drogadependencia endovenosa (ADVP), residencia por cortos períodos en Barcelona (España) y Bahía (Brasil) de 10 y 6 años atrás respectivamente. Los aspectos clínicos más sobresalientes fueron: síndrome rectal doloroso

so, esplenomegalia masiva, lesiones dérmicas máculo-papulosa aisladas; disminución importante de peso, fiebre vespertina y caquexia. Se realizaron laboratorios para pacientes VIH, que revelaron pancitopenia con fórmula conservada, VSG 150mm/h., CD4 78. 10^6 /l, carga viral 194.340 copias. 10^6 /l. Debido a las alteraciones hematológicas, se le practicó una punción de médula ósea (MO); y fibroscopia esofagogastroduodenal y anorectal con tomas biopsicas de masas vegetantes. El primer diagnóstico de *Leishmania sp* fue realizado por observación microscópica directa de un frotis teñido con May Grunwal Giemsa del material obtenido por punción de MO. Además se observaron amastigotes de *Leishmania sp* en los cortes histológicos de las correspondientes biopsias. El tratamiento con antimoniales pentavalentes arrojó resultados favorables disminuyendo el crecimiento de las masas vegetantes intestinales. Se concluye destacando la importancia de solicitar, ante la mínima sospecha (zonas endémicas y un factor de riesgo ADVP, que permitiría la transmisión del parásito por intercambio de jeringas) en un paciente VIH+, la investigación de *Leishmania sp*. La simple microscopía óptica es una técnica sencilla, rápida, de bajo costo y fácil de realizar en cualquier tipo de laboratorio, con lo cual se logra un diagnóstico precoz que posibilita un tratamiento inmediato y específico que ha demostrado ser eficaz

CLI94. Tipificación de leishmania por PCR en un paciente SIDA con Leshmaniasis Visceral. NOCITO I¹, MONTERO A², CAPELLO S², DÍAZ S², DEL FRADE A², SERRA E¹

¹ Fac. de Cs. Bioq. y Farm. ²Fac. de Cs. Médicas. U.N.R. Rosario. Argentina. eserra@arnet.com.ar.

El parásito protozoo del género *Leishmania* causa al humano un amplio espectro de enfermedades en regiones tropicales y subtropicales, siendo considerado un importante problema de salud pública. En América, 15 especies de *Leishmania* del Nuevo Mundo se agrupan en 3 complejos: *Leishmania mexicana*, *Leishmania braziliensis* y *Leishmania donovani*. En los últimos registros, *Leishmania* es reconocida como un patógeno oportunista durante la coinfección con el virus de la inmunodeficiencia humana, donde la enfermedad visceral ha sido asociada con especies parásitas comúnmente identificada con enfermedad cutánea. El objetivo de este trabajo fue identificar la especie de *Leishmania* responsable de la patología que presentó un paciente de 44 años, infectado con HIV. El mismo fue admitido porque presentaba un síndrome rectal agudo. Después de realizarse los análisis de laboratorio y examen endoscópicos, se identificó la presencia de *Leishmania* en tejidos. La terapia fue iniciada de inmediato pero el paciente murió 10 días después.

A los fines de tipificar la especie responsable se realizó una caracterización molecular por ensayo de PCR en un paso para identificar los 3 complejos. Se uso el gen SL RNA multicopia. El DNA fue obtenido por desparafinación de biopsias parafinadas, digestión con proteinasa K, extracción fenol / cloroformo y precipitación alcohólica. Los tamaños de los productos amplificados corresponden: 351-397 bp, 218-240 bp y 146-149 bp para *L. donovani*, *L. mexicana* y *L. braziliensis* respectivamente. El producto amplificado observado en el gel de agarosa al 2% coloreado con bromuro de etidio correspondió a *L. mexicana*. Si bien la *L. mexicana* es un agente típico de enfermedad cutánea, en paciente SIDA la presentación clínica clásica puede cambiar y ser capaz de causar enfermedad visceral diseminada.

CLI95. Study on the post-operative evolution of patients with the hepatosplenic form of Schistosomiasis mansoni submitted from an endemic area in the Rio Doce Valley, Minas Gerais, Brazil, and the University Hospital. CONCEIÇÃO MJ^{1,2}, ARGENTO CA¹, CHAGAS VLA³, TAKIYA CM³, PEREIRA NG¹, AMENDOEIRA MRR⁴

¹Clinic of Infectious and Parasitic Diseases-Dept. of Preventive Medicine, Hospital Universitário Clementino Fraga Filho - UFRJ. Dept of Tropical Medicine - IOC, FioCruz, RJ Dept. of Pathology. ; IOC-FioCruz, RJ. mjconceicao@ioc.fiocruz.br.

A follow-up study was performed on 98 patients with the hepatosplenic form of *Schistosomiasis mansoni* submitted to specific surgery and evaluated in the county of Minas Gerais State, where we have been conducting research since 1973, and at out-patients Clinic for Infectious and Parasitic Diseases at the University Hospital, UFRJ, since 1978. The initial etiologic diagnosis was based on the Kato-Katz method. In addition to clinical examination, abdominal ultrasound was performed for the detection of hepatosplenomegaly and portal hypertension; digestive endoscopy for diagnosis of esophageal varices; histopathological tests on liver and spleen fragments stained with hematoxylin-eosin; total blood count, platelet count, protein electrophoresis, and aminotransferase, matched before surgery and in successive post-operative periods. Reevaluation of patients began in 1995. Of the total 98 patients, 69.3% were males, and age ranged from 13 to 52 years. Most frequent surgical indications were in this order: 1- Previous hemorrhagic episode; 2- Hypersplenism; 3- Continuous pain in left hypochondrium; 4- Risk of ruptured spleen; 5- Infantilism. An association of the first two indications occurred in 69 % of patients. A total of 12 patients (12.2%) died; in 5 cases (5.1%), a diagnosis was made of prior infection with hepatitis B virus, leading to macronodular cirrhosis in 3 patients. The most frequently employed surgical technique was splenectomy with splenorenal or azygo-portal anastomosis, with a smaller proportion submitted to esophageal-gastric decompression. There was an important trend towards progressive normalization of laboratory tests, especially when they returned for medical consultation, submitting to treatment of their esophageal varices, and when there was concomitant infection with hepatitis B virus.

CLI96. Concomitant cases of acquired Toxoplasmosis with a report of Neurotoxoplasmosis in an Immune Competent patient in a housing project in Nova Iguaçu, Rio de Janeiro State, Brazil. AMENDOEIRA MRR¹, VICENTE RT, COSTA T, DA GALDINO M, SILVA SE & CONCEIÇÃO MJ.²

¹Dept. de Protozoologia-IOC-FioCruz; ²Dept. Medicina Tropical-IOC-FioCruz. amendoei@gene.dbm.fiocruz.br.

Acquired toxoplasmosis in immune competent individuals generally presents as the lymphonodal form, but there are rare cases with neurological involvement, although this clinical form is more frequent in immune depressed patients. The occurrence of concomitant cases in one place is usually related to a common mechanism of infection. Thus, having been informed of clinical cases suggestive of acquired toxoplasmosis in a single community, we set out to provide laboratory proof of the initial clinical diagnosis and identify the probable source of infection in order to implement

appropriate prophylactic measures in the target community. Some 47 individuals (40,52%) were tested out of a total of 116 residents Nova Iguaçu, following reports of 15 cases (31,91%) suggestive of infection. All of the individuals were submitted to an epidemiological work-up, including habits and customs in the neighborhood and serological tests (IFI and ELISA) with specific IgG and IgM levels for *T.gondii*. Blood samples were also taken with anticoagulant, in addition to saliva samples to attempt to isolate the parasite in mice. It was not possible to identify the source of infection. Of the 47 individuals studied, 33 (70,21%) were sero-reactive for IgG-IFI, 32 (68,09%) for IgG-ELISA, and 9 (19,15%) for IgM-ELISA; all the 47 were non-reactive for IgM-IFI. In addition to fever, myalgia and arthralgia, some 10 (21,27%) presented enlarged posterior cervical lymph nodes, with the infection confirmed serologically. Only one individual, male, age 49 years, immune competent (HIV-negative), complained of intense headache, loss of conscience, and convulsion-like episodes. Diagnosis of neurotoxoplasmosis was confirmed by cerebral computerized tomography and specific serology (an IgG-IFI of 1/1024 and positive ELISA for IgG and IgM). Following specific treatment, this patient progressed to clinical cure. The occurrence of a case of acquired toxoplasmosis with severe symptoms suggests that infection should not be overlooked in immune competent individuals.

CLI97. Estudio de los síntomas provocados por *Blastocystis hominis* en pacientes externos de un hospital del conurbano bonaerense. CAPUTTI A.

Laboratorio del hospital "Eva Perón" Merlo, Pcia de Buenos Aires. Argentina. acaputti@unimoron.edu.ar.

En los últimos años se ha despertado un creciente interés por el rol de *Blastocystis hominis* como enteropatógeno. Los síntomas más frecuentemente descriptos son diarrea y vómitos. Numerosos trabajos se han realizado para determinar su patogenicidad con resultados dispares. *B. hominis* es un protozoario relacionado con las amebas y se describen diversas morfologías. La infección por *B. hominis* se describe en adultos y especialmente en niños. La alta incidencia de este parásito en las muestras fecales de pacientes que concurren a este laboratorio y, la controversia sobre su significado clínico ha impulsado la evaluación de los posibles signos y síntomas causados por esta enteroparasitosis. **Materiales y métodos:** Se realizó una ficha parasitológica para la obtención de datos y la presencia de síntomas. Las muestras fecales fueron recolectadas sobre el fijador de Junod (SAF) durante siete días. La investigación de *E. vermicularis* se realizó mediante el escobillado anal. Las muestras fueron procesadas por la técnica de Ritchie modificada. Se procesaron 734 muestras. Se consideró muestra positiva para *B. hominis* aquella con dos o más organismos por campo de 40X. No se investigó la presencia de otros enteropatógenos. **Resultados:** De las 734 muestras, *B. hominis* fue encontrado como único parásito en 74 (10,25%) y asociado en 82 (11%). De los 74 monoparasitados, 64 (86%) presentaron algún síntoma y 10 (14%) fueron asintomáticos. El orden de frecuencia de los síntomas fue: prurito anal, dolor abdominal, diarrea, bruxismo, hipopigmentación cutánea localizada. El 88% (65) de los pacientes sintomáticos fueron niños menores de 13 años. **Discusión:** El alto número de síntomas asociados *B. hominis* indica algún grado de alteración clínica provocados por esta infección. Se corrobora que *B. hominis* es causante de un síndrome diarreico al cual se le pueden sumar

otros signos como: prurito anal, y dolor abdominal. Los niños son los más afectados por esta parasitosis. Se encuentra una alta asociación con *E. vermicularis* lo cual sugiere una similar vía de contagio. Se pondera la utilización del fijador de Junod para la identificación de las diferentes morfologías de *B. hominis*.

CLI98. Aislamiento de *Acanthamoeba* en un paciente con queratitis avanzada. LATAPIE L B¹, CARRASCO M A², GUARNERA E¹, CREMONA G².

¹Instituto Nacional de Parasitología Mario Fatale Chaben. ²Servicio de Oftalmología. Sección Córnea. Hospital de Clínicas José de San Martín. lblatapie@uol.com.ar. macarras73@yahoo.com.ar.

Acanthamoeba es un protozoario perteneciente al grupo de Amebas Patógenas de Vida Libre (AVL), se aísla frecuentemente del agua y del suelo. Puede causar queratitis en individuos sanos, la forma clínica de presentación es similar a la queratitis herpética, lo que retrasa el diagnóstico y el tratamiento adecuado con mal pronóstico visual. El 85 % de pacientes infectados utilizan lentes de contacto con inadecuada higiene y/o desinfección. El empleo de soluciones salinas de preparación casera, con agua corriente clorada es una de las principales formas de contagio. También se han reportado casos de pacientes que utilizaban lentes de contacto en prácticas natatorias. La queratitis es producida por la acción directa de la ameba en la córnea que invade el epitelio, el estroma corneal y los nervios corneales (lo que produce dolor ocular muy intenso que es característico de esta enfermedad). En forma tardía, debido a la respuesta del huésped se observa un infiltrado inflamatorio en forma de anillo. Se estudió una paciente de 36 años, que presentaba en el ojo izquierdo visión borrosa, fotofobia y ojo rojo con tres semanas de evolución. El diagnóstico inicial fue de queratitis herpética sin respuesta al tratamiento. A las seis semanas la paciente presenta dolor ocular severo, fotofobia y queratitis estromal en anillo. Se suspende el tratamiento antiviral, realizando exámenes bacteriológicos y virológicos con resultados negativos. Se procede a realizar biopsia de córnea, en este tejido se realizan exámenes en fresco y coloraciones permanentes (tinción Giemsa y tricrómica modificada de Gomori), observando quistes de amebas con características morfológicas de *Acanthamoeba*. Se realizó cultivo xénico en Bactoagar al 2 % aislando a los 4 días trofozoitos y quistes de *Acanthamoeba*. Palabras claves: *Acanthamoeba*, queratitis, lentes de contacto.

CLI99. Leishmaniosis mucocutánea asociada a microfilariosis. Descripción de un caso.- ELUSTONDO P, **CAJAL SP, * TARANTO NJ.

*Inst. Inv. Enferm. Trop. Univ. Nac. Salta. *Hosp. Posadas** ntaranto@oran.unsa.edu.ar.

Desde el brote epidémico de Leishmaniosis Tegumentaria Americana de 1986 en el norte de la provincia de Salta, la leishmaniosis constituye un delicado y hasta ahora insoluble problema de salud pública. De los 1.689 casos confirmados en nuestro Instituto, el 5,8% presentaron la forma clínica denominada Espundia o mucocutánea. En la mayoría de los casos estudiados el agente etiopatogénico resultó ser *Leishmania (V) braziliensis*. Recientemente, diagnosticando a un paciente con hiperemia nasal, obstrucción de las fosas y ulceraciones del septum, de aproximadamente un año de evolución, se detectó en el frotis sanguíneo, formas larvianas compatibles con microfilarias. El paciente fue

confirmado como leishmaniásico a través de la observación de amastigotes por frotis de las úlceras de la mucosa del tabique nasal coloreado con Giemsa. Se cultivó en medio de NNN para, posteriormente, tipificar la especie de *Leishmania* involucrada. La lectura a las 48 hs de la intradermo reacción de Montenegro resulto positiva 25 mm. Como dato epidemiológico, el paciente presentaba cicatrices en el tercio inferior de la pierna, hipocrómicas, depresivas, compatibles con primoinfección por leishmaniosis. Se realizó toma de sangre de la vena del pliegue del brazo con anticoagulante y se procesó por el método de Knott. Se realizaron frotis y gotas gruesas fijando con alcohol metílico y coloreando con Giemsa

lento. Se estableció los niveles de filaremia, arrojando una media de 33.000 microfilarias por ml. Las microfilarias observadas pudieron ser tipificadas como *Mansonella (=Dipetalonema) perstans*, a través de la observación de la distribución de los núcleos y el núcleo terminal de la cola. Este hallazgo constituye un caso único registrado en la literatura en la Argentina y por ende no se conoce su epidemiología. Esta comunicación señala que debe prestarse más atención a las patologías existentes en la zona de las Yungas o nuboselva tucumano oranense, situación que permanece prácticamente desconocida para los principales centros científicos del país y autoridades sanitarias.

QT: QUIMIOTERAPIA

QT100. *In vivo* activities of the triazole derivative BMS-207147 in murine model of acute and chronic Chagas disease. SANOJA C¹, PAYARES G¹, URBINA J².

¹Lab. Inmunología y Quimioterapia, Inst. de Zoología Tropical, Univ. Central de Venezuela, and ²Lab. Química Biológica, Inst. Venezolano de Inv. Científicas, Caracas, Venezuela. csanoja@strix.ciens.ucv.ve.

BMS-207147 is a new oral triazole antifungal agent also known as ER-30346. Has a potent *in vitro* anti-*T. cruzi* activity against epimastigotes and intracellular amastigotes (Urbina et al, 2000). We evaluated *in vivo* the activity of BMS-207147, ketoconazole, benznidazole and nifurtimox in murine model of acute and chronic Chagas disease. In the acute murine model the animals were infected with 10⁵ bloodstream trypomastigotes of the virulent Y strain, oral treatment started 24 hours later and given daily or b.i.d. for 28 days, followed by a 7 days rest and another 15 days of treatment. In the chronic model the mice were inoculated with 10⁴ blood trypomastigotes of Bertoldo strain, which produced slowly developing parasitemia, treatment was initiated 70 days after infection, at which time no circulating parasites were found. The animals were followed by 100-120 days after started the chemotherapy treatment. Parasitological cures were verified using three independent parasitological and serological tests. In the acutely infected mice BMS-207147 at 10 mg/kg given b.i.d. induced 100% survival and 70% of parasitological cures, while no significant level of cures were obtained with ketoconazole or nifurtimox at 40 and 50 mg/kg.d. respectively. In the murine model of long-term disease, BMS-207147 at 5 to 20 mg/kg given b.i.d. provided 70 to 100% protection from death. This results indicate that BMS-207147 has a potent anti-*T. cruzi* activity *in vivo*.

QT101. Extractos crudos de flores de *Heliantus annuus* L ensayados en cultivos "in vitro" de la cepa Tulahuén O de *T. cruzi*. OPPEZZO JA, MARTINEZ RA, MIGLIETTA HF.

Centro de Investigaciones sobre Endemias Nacionales (C.I.E.N.). Pje. El Pozo 3.000 Santa Fe. Argentina.

La tradición le reconoce a los extractos de flores de *H. Annuus* (girasol) acción en la infección humana por Plasmodium, en particular en los casos resistentes a altas dosis de quinina. El objetivo del presente trabajo es evaluar la acción in vitro de extractos crudos de flores de girasol sobre la cepa Tulahuén O de *T. cruzi*. Se prepararon 2 ex-

tractos: uno de ellos por maceración de las flores con etanol 96 ° en la proporción de 1:15 (p/v) durante 15 días. El otro se realizó en las mismas condiciones empleando tolueno. Se determinaron los solubles totales de las extracciones y se adicionaron al medio C.I.E.N. en la proporción de 5,0; 20,0 y 200 mg res seco/l. Luego los medios se inocularon con la cepa Tulahuén O de *T. cruzi* a una concentración inicial de 2,5 10⁷ cel/ml. Se realizaron testigos adicionados con los solventes de los extractos. Los resultados muestran que los dos extractos crudos son depresores del desarrollo del *T. cruzi* asociados a la concentración del extracto. Para 5,0 mg res seco/l es 3 veces más depresor el extracto hidroalcohólico que el de tolueno. A 20,0 mg res seco/l el efecto depresor es similar para ambos extractos.

Con la concentración de 200 mg res seco/l acción es 3 veces mayor para el de tolueno. Para un mismo extracto la concentración de 200 mg res seco/l es 51 veces más depresor que el de 5,0 mg res seco/l para el toluénico. Mientras que para el hidroalcohólico es 4,9 veces más depresor la concentración de 200 mg res seco/l respecto a la de 5,0.

QT102. Resultado del tratamiento para la enfermedad de Chagas con Benznidazol en niños menores de 15 años. Distrito de Gato Colorado, Provincia de Santa Fe, 1999. NEPOTE M, ACHKAR G, DE SANTIS P, MINGO P.

Ministerio de Salud y Medio Ambiente Pcia. de Santa Fe. labcen@arctide.edu.ar

El distrito de Gato Colorado se encuentra ubicado en el noroeste de la Provincia de Santa Fe, en el departamento 9 de Julio. Fue considerado históricamente como zona de endemidad crítica para la patología de Chagas, por los índices de infestación de las viviendas con triatoma infestans y los niveles de infección humana. Luego de finalizadas las acciones de desinsectación de viviendas y de la instalación de la vigilancia entomológica con la estrategia de "Participación Comunitaria" se realizó, en el segundo semestre del año 1997, una encuesta serológica en niños menores de 15 años. Se efectuaron las técnicas de Hemoaglutinación Indirecta (HAI) y enzaimunoensayo (ELISA). Se detectaron 14 niños con serología reactiva para ambas técnicas serológicas. En Enero de 1998, iniciaron tratamiento con antiparasitario específico (Benznidazol 5 mg/kg/día durante 30 días repartido en dos tomas diarias). De los niños tratados, a seis (6) se les realizó a la fecha, serología de control

post-tratamiento. El resto mudó su domicilio o fueron renuentes a efectuar un nuevo control. Resultados: De los 6 niños tratados y controlados 2 negativizaron ambas reacciones serológicas, 2 mantuvieron los títulos de la Hemoaglutinación Indirecta con ELISA reactiva y en los otros 2 se observa una disminución de los títulos de la Hemoaglutinación Indirecta, manteniendo ELISA reactiva.

Conclusiones: - En los niños controlados se pudo observar una respuesta favorable al tratamiento. Son pocos los niños controlados post-tratamiento, por lo que deben intensificarse las acciones de búsqueda y control de los mismos.

QT103. Enfermedad de Chagas: a la búsqueda de una estrategia terapéutica diferente. I. Optimización del diseño de un transportador liposomal de Benznidazol dirigido a macrófagos. MORILLA MJ, CASTRO L, MONTANARI A, BAKAS L*, ROMERO E.

*Departamento de Ciencia y Tecnología, Universidad Nacional de Quilmes (UNQ), Saenz Peña 180, Bernal 1876, Buenos Aires, Argentina. *INIBIOLP, Facultad de Ciencias Medicas (UNLP). elromero@unq.edu.ar*

La ingeniería de transportadores de drogas es de importancia creciente en el campo farmacológico actual. Esta herramienta permite incrementar sustancialmente el índice terapéutico de una droga- en comparación con la droga libre- por encapsulación por ejemplo, en bicapas fosfolipídicas autoselladas (liposomas). Para maximizar la carga de droga, estabilidad en plasma, u optimizar su interacción con un blanco celular dado, cada transportador (T) liposomal (L) de drogas (D) (TLD) debe ser especialmente diseñado. El diseño debe hacerse tanto en función de las propiedades funcionales de las células blanco (forma de ingreso del transportador al interior celular/ fagocitosis, endocitosis mediada o no, etc), como de las características fisicoquímicas de la droga a encapsular. Incluye la elección correcta de los lípidos que compondrán la estructura de membrana del transportador, y el empleo de una estrategia adecuada de incorporación de droga a los liposomas. En el presente trabajo mostramos parte del desarrollo de un TLD aplicable a la enfermedad de Chagas, ya que es posible el acceso de TLD a tejidos infectados donde la permeabilidad vascular se encuentra muy incrementada. Para elegir el método de carga de droga al liposoma, se midió el coeficiente de partición (K_{pc}) de benznidazol (BNZ) entre medio acuoso/ liposomas de diferente composición; asimismo, se midió % de carga de BNZ a diferentes TLD. Las propiedades superficiales los diferentes TLD se ensayaron con la sonda interfacial MC₅₄₀, para elegir aquellas estructuras de membrana que aseguraran máxima opsonización (fase líquido-cristalina). Finalmente, se cuantificó el monto de proteínas plasmáticas adsorbidas a los diferentes TLD generados. Estos datos nos permitieron elegir, en principio, las composiciones eggPC-colesterol 3:1, 1:1 mol: mol, uni (100 nm) y multilamelar como óptimas.

QT104. Estudio de la actividad tripanomicida de la droga tiocianato de 4-fenoxifenoxietilo en ratones con infección chagásica aguda. LÓPEZ QUIROGA I, CIMINO R, NASSER J y RODRÍGUEZ JB .

Cát. de Química Biológica, Fac. Cs. Naturales; LaPE, Fac. Cs de la Salud, Universidad Nacional de Salta y Dpto de Química Orgánica, Fac. de Cs. Exactas y Naturales, UBA. ineslq@unsa.edu.ar.

Diversos laboratorios se encuentran comprometidos en la búsqueda de una quimioterapia eficaz para todas las formas clínicas de la Enfermedad de Chagas. El tratamiento actual de la enfermedad en fase aguda se realiza con benznidazol (BZL). En este trabajo se evaluó la actividad tripanomicida del tiocianato de 4-fenoxifenoxietilo (T4f) en ratones con infección chagásica aguda. Se infectaron cinco grupos (gr) de ratones Swiss con 2000 tripomastigotes sanguíneos de *T. cruzi* cepa Tulahuén. Los ratones recibieron los siguientes tratamientos a partir del día 12 postinfección: gr 1 (n=5): Inóculo i.p. de T4f (50 mg/Kg peso/día) en PBS- Acetato de etilo (Ac. Et.) 5%/30 días; gr 2 (n=5): administración oral de T4f (50mg/Kg peso/día) en PBS-Ac. Et. 5%/30 días; gr 3 (control vía i.p.) (n=5): Inóculo i.p. de PBS-Ac. Et. 5%/30 días; gr 4 (control vía oral) (n=5): administración oral de PBS-Ac. Et. 5%/30 días y gr 5 (control BZL) (n=5): administración oral de BZL (200mg/Kg peso/día)/30 días. Se realizaron estudios de parasitemia directa a intervalos de 48-72 horas y serológicos por ELISA. Hubo una reducción estadísticamente significativa de las parasitemias de los ratones del gr 1 a partir del día 20 del tratamiento respecto del gr 3 (p=0,0006), mientras que el tratamiento con BZL (gr 2) eliminó la parasitemia de los ratones. Con respecto al grupo tratado vía oral no demostró reducción del nivel de parasitemia probablemente por la inactivación de los principios activos de la droga por acción de los jugos gástricos. La serología por ELISA sobre homogenado proteico de *T. cruzi* no mostró diferencias significativas entre los grupos estudiados. Estos resultados revelan la capacidad que posee el tiocianato de 4-fenoxifenoxietilo para reducir la carga parasitaria de los ratones infectados sin afectar la producción de anticuerpos del tipo IgG. Subsidiado por el Consejo de Investigación de la Univ. Nac. de Salta y la Universidad de Bs. As.

QT105. Acción de la O-naftoquinona b-lapachona sobre la ultraestructura del sistema kinetoplasto mitocondrial del tripanosomatide *Crithidia fasciculata*. LÓPEZ LM*, BISCARDI, AM**, PAHN E**, PELLEGRINO DE IRALDI A*, STOPPANI AOM**.

**Instituto de Biología Celular " E.de Robertis" UBA.- Lanais-CONICET ** Centro de Investigaciones Bioenergéticas CIBERG-CONICET. Buenos Aires , Argentina. stoppani@mail.retina.ar.*

La β-lapachona es una O-naftoquinona extraída de la corteza del lapacho. Una característica metabólica de la β-lapachona y sus análogos es su capacidad para participar en reacciones redox y generar radicales libres del oxígeno. El anión superóxido se forma como consecuencia del ciclo redox y origina la producción de H₂O₂ y del radical hidróxilo. A este último se le puede atribuir la citotoxicidad de las naftoquinonas. La *Crithidia fasciculata* es un protozoario kinetoplastido no patógeno para el hombre que posee una sola y extensa mitocondria. Posee un sitio especializado localizado en la matriz, el kinetoplasto k(ADN) estructuralmente organizado como maxicírculos y minicírculos que codifican proteínas esenciales para la función mitocondrial, los citocromos b₁, aa₃ y F₀-F₁ ATPase. **Objetivo del trabajo:** 1) la determinación de la inhibición del crecimiento por acción de la β-lapachona- 2) el estudio de la ultraestructura del *Crithidia fasciculata* (k-ADN) cultivada 24 y 48 horas con β-lapachona 10 μM

Resultados: A) Con 10 μM de β-lapachona se inhibió el crecimiento el 62%. **B) *Crithidias* de 24 hs,** a nivel

ultraestructural, se observó que las membranas mitocondriales son más pequeñas y escasas. El k(ADN) está diskinetoplástico en un 50% de los casos. **Crithidias de 48 hs**, un 25% presentaba signos de autólisis, y el 75 % de *Crithidias* restantes presentó modificaciones en la membrana citoplasmática consistente en la formación de burbujas "blebbing" y "figuras mielínicas". La mitocondria está aumentada de tamaño con las crestas visibles el 30%, mientras que en el resto la matriz es más densa y las membranas se asemejan a grandes vesículas de escasa densidad. **Conclusión:** las modificaciones observadas en el sistema de membranas del parásito confirman el daño celular producido por la citotoxicidad de la β -lapachona especialmente en cultivos de 48 hs.

QT106. Efectos adversos durante el tratamiento con Benznidazol en infectados chagásicos en fase indeterminada de la enfermedad: prevalencia y manejo clínico. LACUNZA CD¹, SÁNCHEZ NEGRETTE O¹, DEL CASTILLO N², GARAYZABAL MI², BASOMBRÍO MA¹.

Universidad Nacional de Salta, Argentina. 1. Laboratorio de Patología Experimental Facultad de Ciencias de la Salud. 2. Dirección de Sanidad. rusalta@arnet.com.ar.

Recientes normativas de Brasil y Argentina (Resolución Secretaría de programas de Salud/Ministerio de Salud y Acción Social de la Nación N° 28/99) amplían la recomendación de tratamiento antichagásico a pacientes adultos. En el tratamiento con Benznidazol (5mg/kg/día 60 días) de infectados chagásicos en fase indeterminada de la enfermedad está descrito hasta un 40 % de efectos adversos. Nosotros hemos tenido 39.13% en 23 pacientes (Media 24.78 DS 6.11 Rango 15-41; Fem 13 Masc 10), con la siguiente prevalencia: Exantema macular pruriginoso 44%, Polineuropatía 22%, Disminución de la percepción del gusto 11%, Astenia 11%, Intolerancia hepática 11%. Todos los casos de dermatopatía fueron femeninos. En todos los casos de intolerancia se redujo la dosis a 1 comprimido/día por una semana. Si los síntomas no retrogradaban se suspendió otra semana (en el caso de la disminución del gusto por dos semanas) y si retrogradaban se recomenzó paulatinamente. La dermatopatía se trató con Loratadina y la polineuritis con antiinflamatorios. En ambos casos con éxito. Se suspendió el tratamiento en tres pacientes: dos casos de dermatopatías que no respondieron al manejo clínico y en un caso de elevación de enzimas hepáticas (> de 3 veces el valor basal). A los pacientes se los controló con interrogatorio médico semanal-quincenal; hemograma-hepatograma-dosaje de urea-creatinina y eritrosedimentación a los 0, 30 y 60 días del tratamiento.

Agradecemos a MUSELI T, MORA MC, UNCOS A, RAMOS F. Financiado por CONICET y CIUNSA.

QT107. Parámetros parasitológicos para la evaluación temprana de tratamiento antichagásico: evaluación de PCR y hemocultivo en pacientes jóvenes en fase indeterminada. LACUNZA CD¹, SÁNCHEZ NEGRETTE O¹, MORA MC¹, DEL CASTILLO N², GARAYZABAL MI², UNCOS A¹, BASOMBRÍO MA¹.

Universidad Nacional de Salta, Argentina. 1. Laboratorio de Patología Experimental Facultad de Ciencias de la Salud. 2. Dirección de Sanidad. rusalta@arnet.com.ar.

La evaluación de tratamientos antiinfecciosos debería basarse, idealmente, en determinaciones que indiquen infec-

ción y/o patología antes de la cura y negativización después de la misma. En la infección humana por *Trypanosoma cruzi*, los parámetros clínicos no son aplicables a la fase indeterminada: los parasitológicos son de baja sensibilidad y los serológicos dan resultados diferidos a 6 meses y 1 año postratamiento. El PCR y hemocultivo podrían superar en cierta medida estas dificultades. Hemos realizado una evaluación preliminar de estos métodos, examinando, por ahora, la positividad pretratamiento como base para medir su ulterior negativización. Se estudiaron 36 pacientes jóvenes (Media: 23.52; DS 5.19; Rango: 13-35), seropositivos y en fase indeterminada de la enfermedad. Luego de confirmarse la serología externa con técnicas HAI y ELISA, se aplicaron, pretratamiento, las técnicas de hemocultivo (1 ml de sangre sembrada en 5 tubos con medio LIT) y PCR. Para esta técnica se emplearon 6 ml de sangre en igual volumen de buffer-guanidina. Luego de hervir la muestra se extrajo DNA a partir de 100 ml de la misma. Utilizando los primers N° 121 y 122 se amplificaron secuencias de DNA cinetoplástico, identificables en una banda de 330 pares de bases. El hemocultivo reveló infección en 3/33 pacientes (9.09%). El PCR fue positivo en 26/36 (72.22%). En sujetos seronegativos esta técnica nos ha venido dando solamente 3,8 % (1/25) de positividad. La mayor sensibilidad y rapidez de ejecución del PCR indica que su empleo en los controles postratamiento podría indicar precozmente la efectividad curativa en pacientes adultos en fase indeterminada de la enfermedad.

Agradecemos a MUSELI T y RAMOS F. Financiado por CONICET y CIUNSA.

QT108. Estudio de intervención en la evolución natural de la enfermedad de Chagas: Evaluación del tratamiento antiparasitario específico. Estudio retrospectivo-prospectivo de terapéutica antiparasitaria. GALLERANO R, SOSA R.

Sevicio de Cl. Médica del H. Córdoba y Catedra de Medicina III Fa. De Medicina de la U.N.C. Córdoba, Argentina.

Experiencia terapéutica intervencionista comparativa de Benznidazol, Nifurtimox y Allopurinol, en un seguimiento prospectivo a largo plazo valorando las respuestas de la parasitemia, serología específica y evolución de las manifestaciones clínicas y complementarias de la enfermedad en 535 chagásicos crónicos (44,5%), mientras que 668 no recibieron tratamiento entre Abril de 1984 y Abril de 1994 en pacientes con o sin cardiopatía, de los cuales recibieron Allopurinol 309 pacientes, Benznidazol 130 pacientes y Nifurtimox 96 pacientes, a dosis habituales para Benznidazol y para Nifurtimox, mientras que con Allopurinol se realizó un estudio de la evaluación de la dosis-respuesta, con un tiempo de seguimiento postterapéutico promedio de 55.6 meses (D.S. = +- 57 m.). Se observó una prevalencia de Alteraciones en el ECG de reposo de la primera evaluación complementaria en 76 de los 535 «Tratados» y en 225 de los «No Tratados», siendo mucho mayor la proporción en los «No Tratados» (P = 0.000000). Finalizado el período de seguimiento, se encontraron evidencias de Progresión del daño Miocárdico en 120 pacientes «No Tratados» y en 31 «Tratados» (17.9% y 5.8% respectivamente.) (P = 0.000000); Complicaciones en 113 de los «No Tratados» y en 19 de los «Tratados», (16.9% y 3.5%), diferencia estadísticamente significativa (P = 0.000000) y Mortalidad 37 de los «No Tratados» y en 7 de los «Tratados», (5.5% y 1.3%), diferencia estadísticamente significativa (P = 0.00019). El fár-

maco de mejor tolerancia y el que presentó menor incidencia de abandonos terapéuticos fue el Allopurinol. Se concluye que cuanto más precozmente se instaure el tratamiento antiparasitario específico, aumentan las posibilidades de que este sea efectivo, así como también, las probabilidades de prevenir o disminuir la incidencia de cardiopatía en infectados crónicos o de detener su evolución y disminuir su morbimortalidad en los pacientes con cardiopatía ya instalada.

QT109. Estudios farmacológicos de potenciales agentes tripanocidas. DI MAIOR¹, CABRERA E¹, CERECETTO H¹, GONZÁLEZ M¹, SEOANE G¹, FERNÁNDEZ M¹, AGUIRRE G¹, ROSA R², GONZÁLEZ M², PACHECO P³, ARREDONDO C³

¹Departamento de Química Orgánica, Facultad de Química y Facultad de Ciencias, ²Cátedra de Parasitología, Facultad de Medicina, ³Cátedra de Anatomía Patológica, Facultad de Veterinaria. Montevideo, Uruguay, rmaio@bilbo.edu.uy.

La enfermedad de Chagas es una endemia parasitaria que afecta a millones de habitantes en Latinoamérica.

Continuando con el trabajo de desarrollo de agentes antichagásicos, se describe el estudio farmacológico de compuestos sintetizados con potencial actividad tripanocida.

Se realizan ensayos de actividad *in vivo* sobre modelo animal de enfermedad de Chagas. Se utilizan ratones CD1 infectados con *Trypanosoma cruzi* cepa Garbani, se aplica un cronograma de administración pre-establecido y se controla la parasitemia por recuento de la forma circulante del parásito en sangre.

Por otro lado, como índice de toxicidad de los compuestos, se determina la máxima dosis tolerada de los mismos. Para ello se somete a la misma cepa de ratones a administración oral e intraperitoneal de los compuestos a dosis superiores a las terapéuticas. En ambos estudios se utiliza Nifurtimox[®] como fármaco de referencia. Como complemento a los estudios de actividad y de toxicidad se realizan las anatomías patológicas de órganos de los animales utilizados en los bioensayos. Se analizan hígado, riñón y sistema nervioso central, y se buscan formas amastigotas de *T. cruzi* en corazón, aparato digestivo y músculo esquelético.

QT110 Actividad Antiproliferativa de un alcaloide marino sobre promastigotes de *Leishmania mexicana* (NR). ARRIECHE D¹, RODRÍGUEZ P², LUNA R¹, BOADA-SUCRE A³, ARMAS J⁴, HENRIQUEZ W⁵, CRESCENTE O⁵ & MARCHAN E¹.

¹IIBCA-UDO. Cumaná, Sucre, Venezuela. ²CME-UCV. ³IDECYT-USR. ⁴Dpto. Biología-UDO. ⁵Dpto. Química-UDO. darriech@cumana.sucre.udo.edu.ve

La búsqueda de blancos diferenciales para el tratamiento de la leishmaniasis, con productos que no causen efectos secundarios, motivó el empleo de varios métodos para dilucidar el mecanismo de acción de un alcaloide aislado de *Amphimedon viridis* (Porifera) sobre promastigotes de *Leishmania mexicana* (NR). Los parásitos se cultivaron en medio *Drosophila*-Schneider (26 °C) suplementado con suero fetal bovino (5%); en la fase de crecimiento exponencial (10⁷ parásitos/ml) se examinaron los efectos al microscopio electrónico de transmisión, microscopio electrónico de barrido y por criofractura y réplica (FFR), a los 30 min. y 24 hr, de someterlas a la concentración del alcaloide que inhibe 50% la tasa de crecimiento (4 µg/ml), la concentración mínima inhibitoria (CMI, 8 mg/ml) y la dosis letal media

(DL₅₀, 10 mg/ml). Por fotometría de llama se cuantificó la permeabilidad selectiva del ion potasio (K⁺) a los 15 y 60 min. con la CMI y DL₅₀. Se evaluó la citotoxicidad con eritrocitos humanos por un método colorimétrico. El alcaloide produjo un efecto dosis dependiente, con pérdida de la movilidad celular, hinchamiento y lisis. La ultraestructura celular presentó desorganización del material citoplasmático, vacuolización extensa, separación de la membrana celular y de la membrana de la bolsa flagelar, con formación de poros de diferente diámetro en la superficie celular. Por FFR se observó agregación de las partículas intramembranas (IMP), y vacuolización en la membrana del flagelo. Con la CMI y DL₅₀ a los 15 y 60 minutos respectivamente se obtuvo una pérdida del 58% y 65 % del K⁺ intracelular. La citotoxicidad del alcaloide sobre los eritrocitos fue dos órdenes de magnitud mayor que la CMI. Los resultados indican que el alcaloide actúa sobre el complejo membrana celular-citoesqueleto, alterando la morfología celular, así como la permeabilidad selectiva, asociado a la agregación de las IMP, que conducen a la pérdida de movilidad, hinchamiento y lisis celular.

QT111. Eficacia del tratamiento con nifurtimox en 86 casos de chagas congénito. ALTCHER J, BIANCARDI M, CONCA MORENO M, TORRES N, FREILIJ H.

Parasitología, Hospital de Niños "Ricardo Gutiérrez". Buenos Aires. jaltcheg@intramed.net.ar.

Presentamos el análisis de la respuesta al tratamiento en 86 niños con Chagas congénito en una zona no endémica.

Criterios de inclusión: madre serológicamente reactiva, niño que no haya recibido transfusiones, ni haya permanecido en zona endémica. Seguimiento mínimo de 3 meses post-tratamiento. **Criterios diagnósticos:** en los < de 6 m presencia de *T. cruzi* por microhematocrito, en > de 6 m: 2 técnicas serológicas reactivas (Hemaglutinación indirecta y ELISA o Aglutinación directa). **Población:** n: 86. Edad: mediana 8.5 meses (10d-120m). **Clínica:** Asintomáticos 75.6%, Hepatoesplenomegalia 8.6%, Sepsis 1.2%, Miocarditis 2.3%, Hepatitis 2.3%.

Esquema terapéutico: Nifurtimox 10-15 mg/Kg/día por 60-90 días. **Efectos adversos:** Ninguno: 69.9%, Anorexia: 8.8%, Vómitos: 6.2%, Irritabilidad: 10.6%, Cefalea: 2.7%, Leucopenia: 1.8%. **Seguimiento:** control serológico cada 3 meses en el 1er año y luego cada 6 meses; control cardiológico anual. El tiempo de seguimiento post-tratamiento presentó una mediana de 3 años (3 meses- 11 años).

Criterios de curación: negativización persistente de la serología por 2 técnicas.

Resultados: 75/ 86 (87.2%) de los pacientes presentaron seronegativización. En los < de 3 años la seronegativización fue de un 98%. Los niños curados presentaron una media de edad de 12 meses, y la mediana fue de 6 meses (IC₂₅₋₇₅ 2-15) y los no curados una media de 57 meses y una mediana de 48 meses (IC₂₅₋₇₅ 13 -108). p<0.001.

Conclusiones: El tratamiento es efectivo en el 98% de los niños tratados precozmente. La medicación fue bien tolerada. Sugerimos el screening de toda embarazada para Chagas.

QT112. Parámetros bioquímicos en el tratamiento con benznidazol ARIAS M, *GASTAL Y, PETRINO L, ***ROSSO N, ***DAQUINO E, ***ARRIETA R.

Hospital Quines, *San Francisco y **Luján, ***Laboratorio de Salud Pública. Provincia San Luis, Argentina.

Las normas de tratamiento indican que los pacientes con enfermedad de Chagas en la fase crónica reciente pueden recibir tratamiento etiológico, por ejemplo, con benznidazol.

Se utilizaron las siguientes reacciones bioquímicas para detectar la parasitemia: Strout y gota fresca; HAI, ELISA e IFI para identificar los anticuerpos específicos y para medir los posibles efectos adversos de la droga: hemograma, transaminasas, creatinina y orina completa. En el año 1994 se trataron 11 niños asintomáticos, con edades comprendidas entre 1 a 6 años, residentes en el Departamento Ayacucho (Provincia de San Luis), zona endémica bajo vigilancia vectorial. Benznidazol: 5 mg/kg/día, administrado en dos dosis diarias durante la primera semana, aumentando a 6mg/kg/día hasta cumplir los 30 días. La asistencia médica y bioquímica fue semanal durante la toma del medicamento. Todos los pacientes presentaron parasitemia negativa, siendo reactivos a las tres pruebas serológicas (títulos comprendidos entre 1/32 a 1/256). El seguimiento serológico postterapéutico se realizó a los 6 meses, posteriormente una vez al año, continuando. La seroconversión negativa y constante se alcanzó en 6 pacientes (54,5%), entre el primer semestre y los 2 años; 3 disminuyeron sus títulos; 1 es negativo sólo a HAI y 1 se desconoce su nuevo domicilio. Cuando se comenzó la medicación los valores de los parámetros bioquímicos señalados eran normales, los que se mantuvieron hasta finalizar la misma. La excepción fue el número de plaquetas (método de Fonio), que experimentaron en 9 niños (82%) disminuciones comprendidas entre el 22 al 38%. La recuperación a valores normales transcurrió entre el 2º y el 5º mes postratamiento.

Creemos oportuno realizar el tratamiento etiológico con benznidazol a los niños infectados chagásicos, que viven en zona bajo vigilancia vectorial, por los cambios logrados en la serología específica y la tolerancia a la droga, a pesar de la depresión medular que alcanzada a la línea celular megacariocítica.

QT113. Evaluation of the effect of amidine derivatives on the ultrastructure of *Leishmania amazonensis* promastigotes. TEMPORAL RM⁽¹⁾, CYSNE-FINKELSTEIN L⁽¹⁾, CÔRTE-REAL S⁽²⁾, ECHEVARRIA A⁽³⁾ & LEON LL⁽¹⁾

¹Departamento de Imunología, ²Departamento de Ultraestructura e Biología Celular, Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brasil; ³Departamento de Química, Instituto de Ciências Exatas, UFRRJ, Rio de Janeiro, Brasil.

There are several reports concerning ultrastructural changes in *Leishmania* parasites, mainly in the flagellar pocket, mitochondria and kinetoplast upon the action of diamidines, specially Pentamidine. We have studied the activity of N, N'-diphenyl-4-R-benzamidines on both developmental stages of *Leishmania amazonensis* and found that the most effective compounds were those with Br and OCH₃ as substituents. In this work we evaluated ultrastructural modifications in the parasite and the host cell, as a result of the effect of those amidine derivatives. Drugs were added to the promastigote and macrophage cultures in a concentration of LD50/24h for all compound, as follows: methoxy [LD50=4,34 µg/mL (14,00 µM)] and Br [LD50= 8,00 µg/mL (22,00 µM)]. In all experiments pentamidine isethionate [LD50= 0,278 µg/mL (0,46 µM)] was used as reference drug. Our results corroborate with the data from literature, since when *L. amazonensis* promastigotes were treated with both Pentamidine and OCH₃-amidine it was observed by

transmission electron microscopy, changes in kinetoplast electron density, nuclear chromatin structure and flagellar membrane alterations. No ultrastructural change was detected in Balb-c peritoneal macrophages. In reference to Br-amidine, it was not possible an evaluation, since this compound was very toxic, destroying completely the cells.

QT114. Amidine derivatives used in an experimental treatment of cutaneous lesions caused by *Leishmania amazonensis*. TEMPORAL R M⁽¹⁾, PALUMBO ST⁽¹⁾, ECHEVARRIA A⁽²⁾ & LEON L L⁽¹⁾

¹Departamento de Imunologia, Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brasil; ²Departamento de Química, Instituto de Ciências Exatas, UFRRJ, Rio de Janeiro, Brasil.

The treatment of all clinical forms of leishmaniasis is still inefficient presenting several side effects. Previously, we have studied the activity of N, N'-diphenyl-4-R-benzamidines, where R = H, Cl, Br, CH₃, OCH₃, NO₂ and CN on both developmental stages of *Leishmania amazonensis* and it was observed that the most effective compounds were those with the methoxy and Br as substituents. Based in previous data from our laboratory, showing that methoxy amidine present no toxicity both "in vivo" and "in vitro" experiments, we decide to try a treatment with this compound and using pentamidine as a reference drug. A treatment trial was done in different groups of Balb/c mice inoculated subcutaneously in the footpad with 1x10⁷ promastigotes. After 60 days of infection, animals were treated for a period of four weeks, with methoxy amidine and pentamidine, following two different schedules: a) intralesional – drugs in a concentration equivalent to the LD50/24h, were inoculated weekly surrounded the margin of the lesions; b) topic – drugs in a concentration 10 times of the LD50/24h, were mixed with a inert vehicle and applied daily directly on the lesion. Control group received no treatment.

The results were very promising, with the methoxy-derivative being more efficient than Pentamidine in both schedules of treatment. Following the lesions development, it was observed that using the topic treatment, up to the fourth week there was no increase in the lesion size, although with Pentamidine, up to the third week no difference comparing to the control was observed. Regarding the intralesional route, after the fourth week of treatment, mice treated with methoxy-amidine showed a significative decrease in the lesion size, comparing to the control or to those who received Pentamidine.

QT115. Teniosis: Casuística y experiencia terapéutica con Praziquantel. BARNES A, NIETO SOSA L, SICILIANO C.

IIº Cat de Parasitología Fac Ciencias Ms. UNC. Servicio de Parasitología, Hospital Rawson, Minist de Salud, Córdoba, Argentina.

Objetivos: Conocer la frecuencia de esta cestodiasis en nuestro medio y evaluar la respuesta al praziquantel.(PZQ).

Material y métodos: Ante la falta de un medicamento eficaz para teniasis humana y al conocerse el uso del PZQ en veterinaria con resultados favorables, decidimos, con el aporte de un laboratorio de específicos, iniciar en 1990 este estudio.

Por la consulta espontánea o derivada de pacientes portadores de tenias se investigaron y trataron en un período de 10 años: 178 individuos (100%) de los cuales 103 (58

%) eran mujeres, cuyas edades oscilaron entre 20 y 60 años y 75 varones (42 %) entre 20 y 50 años. Un importante número provenía de zonas rurales del interior provincial. Todos consultaron por eliminación de proglótidos (100 %). Fueron referidos síntomas como náuseas, epigastralgia, prurito anal y cefalea, siendo destacables los trastornos psicológicos como ansiedad, sensación de asco y vergüenza.

Resultados: El diagnóstico se realizó mediante la observación de anillos e identificación de especie, en un solo caso se trató de *Tenia solium*, el resto de *T. saginata*. Posteriormente fueron tratados con PZQ 10 mg/Kg de peso D.U., sin evidenciarse efectos colaterales, los controles CPS fueron (-) a los 30, 60 y 90 días.

Conclusiones: Este estudio nos permitió corroborar el alto predominio de *Tenia saginata*, como así también que el grupo más frecuentemente afectado era de adultos con mayoría de mujeres. El PZQ fue efectivo y seguro en el 100 % de los tratados. Destacamos que el 95 % de los pacientes habían sido tratados reiteradamente con diversos antihelmínticos sin éxito.

QT116. Efecto de un desinfectante sobre el desarrollo y viabilidad de huevos de *Toxocara canis*. LOPEZ MA, RAMOS PA, RADMAN NE, OSSEM BA, BIONDI M.

Catedra de Parasitología Comparada, Laboratorio de Parasitosis Humanas y Zoonosis parasitarias. Fac. de Ciencias Veterinarias UNLP. La Plata, Argentina. nildarad@fcv.medvet.unlp.edu.ar.

Toxocara canis es probablemente uno de los más comunes helmintos gastrointestinales en caninos que infecta ocasionalmente al hombre (zoonosis). La parasitosis en animales ocurre por ingestión de huevos maduros (conten-

niendo en su interior la larva 2), infección del feto por pasaje de larvas a través de la placenta, ingestión de larvas con el calostro y la leche e ingestión de hospedadores paraténicos. Las larvas cumplen un ciclo migratorio (según el estado fisiológico del animal) que termina en el intestino donde copulan y oviponen. Toxocarosis es una enfermedad zoonótica. Después de la ingestión de huevos infectantes por el hombre las larvas producen una migración somática (larva migrans visceral u ocular) que pueden ocasionar serias lesiones y aún la muerte.

Objetivo: Probar el efecto de un producto comercial AMBITUS (Laboratorio Nieser) sobre el desarrollo y viabilidad de huevos de *T. canis*.

Materiales y métodos: Huevos de *T. canis* obtenidos de hembras adultas, producto comercial a las dil. 1/50 y 1/100, Placas de Petri, papeles de filtro, ratones Balb/c. Los huevos de *T. canis* fueron sometidos a la acción del desinfectante a las dil. 1/50 y 1/100 en dos diferentes condiciones: a) sumergidos en el desinfectante y mantenidos en placas de Petri y b) tratados durante 10 minutos y volcados sobre papeles de filtro. Los huevos de las condiciones a, b y los testigos se mantuvieron 30 días realizándose observaciones periódicas. Posteriormente los huevos tratados y los testigos fueron inoculados respectivamente en ratones por vía intragástrica.

Resultados: Al recuperarse los huevos presentaban alteraciones en su morfología (alteración de color, inmovilidad de las larvas etc.). Los ratones se sacrificaron a las 72 Hs. postinoculación y no se hallaron larvas migratorias de órganos internos de los ratones inoculados con huevos tratados y si en los ratones testigos. De lo expuesto se deduce que el producto actuó nocivamente sobre los huevos de *T. canis*.

DG: DIAGNÓSTICO

DG117. Desarrollo de un sistema de diagnóstico para Babesiosis y Anaplasmosis bovina utilizando proteínas recombinantes. FARBER M¹, MONDILLO C¹, WILKOWSKY S¹, FLORIN-CHRISTENSEN M^{1,3}, S, ECHAIDE I², TORIONI DE ECHAIDE S².

¹CICVya, INTA, Castelar, Argentina, ²INTA EEA-Rafaela, Argentina, ³Department of Veterinary Microbiology and Pathology, Washington State Univ., Pullman, USA. mfarber@cicv.inta.gov.ar.

En la actualidad el serodiagnóstico para babesiosis y anaplasmosis bovinas se realiza a través de ensayos de inmunofluorescencia y aglutinación en placa, utilizando preparaciones de antígenos crudos, de difícil estandarización.

El principal objetivo de este proyecto es el desarrollo de un método de diagnóstico específico y sensible que permita detectar simultáneamente infecciones provocadas por *Babesia bovis*, *Babesia bigemina* y *Anaplasma marginale*, utilizando proteínas recombinantes. Los antígenos seleccionados en base a su probada inmunodominancia para ser utilizados como proteínas recombinantes fueron: RAP-1 de *B. bovis*, RAP-1a de *B. bigemina* y MSP-5 de *A. marginale*. Los genes correspondientes a dichas proteínas fueron clonados en el sistema de expresión bacteriano pBAD/TOPO ThioFusion Expression System de INVITROGEN. Los productos resultantes fueron purificados por cromatografía de afinidad. Cada uno de los antígenos recombinantes por sepa-

rado fueron evaluados en ensayos de western blotting, utilizando una batería de 30 sueros de bovinos infectados experimentalmente y otra batería de 60 sueros bovinos provenientes de áreas endémicas y utilizando como referencia los test serológicos actuales. Los resultados preliminares indican que dichas proteínas son capaces de identificar y diferenciar adecuadamente a los animales infectados con cada uno de los hemoparasitos. A través de estas herramientas será posible desarrollar un método rápido y sencillo basado en los conceptos básicos de la técnica de ELISA, que permita su utilización a campo sin la necesidad de recurrir a tecnología sofisticada, lo que permitirá realizar estudios epidemiológicos de importancia sanitaria para la ganadería de nuestro país.

DG118. Utilidad del PAP para diagnosticar *T. vaginalis* COSTAMAGNA SR*, PRADO FIGUEROA M*, SORIA O**, FUENTES A** y FERREYRA R**.

*Cátedra de Parasitología Clínica, Departamento de Biología, Bioquímica y Farmacia. Universidad Nacional del Sur. San Juan 670 - (8000) Bahía Blanca. **Hospital Municipal "Leónidas Lucero". (8000) Bahía Blanca. rcostama@criba.edu.ar

En el presente trabajo se efectuó la validación de la coloración de Papanicolaou, utilizada para citología vaginal, frente a la coloración fluorescente con naranja de acridina, a fin

de evaluar el valor de un resultado negativo para *Trichomonas vaginalis* obtenido en un PAP. Se estudiaron 80 muestras de flujo vaginal de mujeres entre 18 y 45 años, pacientes de consultorios externos de Ginecología del Hospital Municipal de la ciudad de Bahía Blanca, Provincia de Buenos Aires (Argentina). Las muestras se colorearon paralelamente por la técnica de Papanicolaou y por la coloración fluorescente con naranja de acridina descrita por Fripp en 1975. Los resultados mostraron que el PAP presenta una sensibilidad del 54,54% para la detección de *T. vaginalis*, validación efectuada frente a la coloración fluorescente con naranja de acridina, para una prevalencia de enfermedad en el grupo de mujeres estudiadas del 13,75% y un nivel de confianza del 95%. Para ensayos “en paralelo” con ambas coloraciones, el valor global de la prueba fue del 93,75%, con un valor predictivo del resultado negativo del 93,24%. Concluimos que si bien *T. vaginalis* es detectada en el PAP, éste no presenta sensibilidad significativamente elevada como para ser considerada como única prueba para el diagnóstico, debiéndose complementar siempre con una coloración fluorescente con naranja de acridina, caso contrario la sensibilidad diagnóstica no superaría al examen en fresco del flujo vaginal.

DG119. Dosaje de anticuerpos contra *Toxoplasma gondii* por el método de hemaglutinación indirecta para la valoración del riesgo de primoinfección en embarazadas. CANOVA GM.

Hospital Zonal de Merlo y área de influencia. Merlo. San Luis. Argentina. Serceba@infovia.com

Se dosaron Acs. Contra *T. gondii* por el Mét. de HAI con o sin 2-ME a 382 embarazadas durante el primer control, sin discordancias significativas entre los sueros tratados y los sin tratar con 2-ME obteniéndose los siguientes resultados:

Total de emb. 1º control	Total de emb. Resultado reactivo	Dil 1:2	Dil. 1:4	Dil. 1:8	Dil. 1:16	Dil.= 1:32
382	129	0	3	31	26	69

Es muy probable que la falta de hallazgos de títulos bajos se deba a que HAI puede dar falsos resultados no reactivos englobándolos en rango de seronegatividad y demora en la elevación de títulos en los controles realizados a intervalos de tres semanas, lo que hace que no sea el más adecuado en Toxoplasmosis congénita. Títulos bajos (1:2 y 1:4) deberían poder ser detectados, incluidos y valorados ya que sólo *Hanmondia hamondi*, protozoario muy poco común, da reacción cruzada con

T. gondii. Además porque en esta parasitosis, títulos bajos hasta de 1:2 son comunes en coriorretinitis toxoplásmica. Se propone que embarazadas seronegativas sean examinadas todos los meses de gestación. Para aquellas con resultado reactivo inicial por HAI, realizar la búsqueda de Acs. IgM específico (ELISA IgM ó ELISA IgM DS) en el mismo suero, en Centro de Referencia, para detectar y confirmar primoinfección.

DG120. Red de diagnóstico de Hidatidosis y Toxoplasmosis. SANTILLAN G, MONKIEWICZ A, CESPEDES G.

Instituto Nacional de Parasitología. ANLIS “Dr. Carlos G. Malbrán”. Buenos Aires, Argentina. adrimonk@anlis.gov.ar

En el Departamento de Parasitología Sanitaria, durante el corriente año, se comenzaron a desarrollar distintas actividades y así conformar las redes para diagnóstico de Hidatidosis (en humanos), Echinococcosis (en perros) y Toxoplasmosis. Con respecto a Hidatidosis, se distribuyeron materiales (antígeno y antisuero de referencia) para el diagnóstico por las técnicas de DD5 y ELISA a 7 laboratorios en distintas provincias (Río Negro, Córdoba, Santa Cruz, Tucumán y Buenos Aires: Lanús, San Fernando y Mar del Plata); se recibieron muestras para estudios epidemiológicos de las provincias de Mendoza y Catamarca, y muestras para confirmación de diagnóstico de las provincias de Mendoza, Catamarca, Tucumán, Corrientes, Chaco y Córdoba. De la Provincia de Tucumán se recibieron muestras para seguimiento por serología de pacientes operados o tratados químicamente. En Echinococcosis, se llevó a cabo la primera reunión de Organización de la Red de Echinococcosis, en la cual participaron 21 profesionales de diferentes provincias, en el marco del Primer Curso de Diagnóstico de Echinococcosis. También se recibieron muestras de materia fecal de perros para procesar por Copro-ELISA y confirmar por Copro-Western blot de las provincias de Buenos Aires (Azul), Neuquén, Río Negro y Catamarca.

En el caso de Toxoplasmosis, se comenzó a implementar un programa de Control de Calidad Externo para Laboratorios, distribuyendo a 6 laboratorios de Capital y Gran Buenos Aires, sueros controles (positivo alto, positivo débil y negativo), que fueron procesados por las técnicas que empleaba cada laboratorio participante. Las respuestas recibidas desde cada laboratorio fueron concordantes en los resultados, salvo en un laboratorio en el control positivo débil suministrado.

Los pasos a seguir para continuar desarrollando el funcionamiento de las Redes son: la incorporación de más laboratorios a la red, la realización de más cursos de capacitación y el intercambio de muestras controles y desconocidos.

DG121. Inmunodiagnóstico de distomatosis mediante el empleo de catepsina recombinante. CARNEVALE S, RODRÍGUEZ M, GUARNERA E, FERNÁNDEZ G, TANOS T, ANGEL S.

Departamento de Parasitología Sanitaria. Instituto Nacional de Parasitología. ANLIS “Dr. Carlos G. Malbrán”. Buenos Aires. Argentina. jorsil@overnet.com.ar

Una de las principales moléculas en los productos de excreción-secreción de *Fasciola hepatica* es la cisteína proteasa catepsina L-1. En este trabajo se presenta la producción de dicha proteína en forma recombinante y la evaluación de su potencialidad como reactivo diagnóstico para fascioliasis mediante ELISA.

Se purificó RNA total de adultos de *Fasciola hepatica* y se empleó la técnica de RT-PCR con primers específicos para obtener cDNA de catepsina L-1. Dicho cDNA se clonó en el vector T pGEM, se secuenció, subclonó en el vector de expresión pQE-30 y se expresó en la cepa de *E. coli* M15. La producción de rCL-1 se llevó a cabo mediante cultivos inducidos y purificación en resina de níquel. Las fracciones de elución que contenían la molécula recombinante se emplearon como antígeno en la técnica de ELISA. Mediante esta metodología se evaluó la curva de respuesta inmune en sueros de 10 ovinos experimentalmente infectados con metacercarias durante 3 meses (material cedido por el Dr. Carmona, Instituto de Higiene, Uruguay). Los resultados

obtenidos mostraron un aumento del título de anticuerpos a partir de la tercera semana post-infección en los animales. También se analizaron 16 sueros humanos de pacientes con distomatosis comprobada coprológica y/o quirúrgicamente, 99 sueros negativos y 109 correspondientes a otras parasitosis y patologías. En estas muestras el test mostró una sensibilidad y una especificidad del 100% con un cut off de 0.4 UA₄₁₀ a dilución 1:250 de los sueros.

La proteína recombinante cathepsina L-1 demostró un excelente potencial como antígeno para el diagnóstico de fascioliasis en humanos y ovinos, permitiendo la estandarización de un método diagnóstico basado en el ELISA.

DG122. Trichinellosis: a propósito de un peritaje judicial. COSTAMAGNA SR.

Cátedra de Parasitología Clínica. Universidad Nacional del Sur. San Juan 670 (8000) BAHIA BLANCA. Argentina. rcostama@criba.edu.ar

En la ciudad de Bahía Blanca, durante el año 1997 se produce un brote de Trichinellosis de origen comercial, con 147 casos. Debido a este episodio, el municipio efectúa controles bromatológicos pertinentes en las diferentes bocas de expendio de la ciudad y encuentra jamones parasitados en una importante cadena local de supermercados, procediendo a su decomiso. Posteriormente, ante demanda entre supermercado y frigorífico se inicia causa judicial caratulada: "Averiguación sobre adulteración de sustancias alimenticias- Propagación de Triquinosis en Frigorífico". Es por este motivo que el señor Juez Federal interviniente, previa consulta con la Universidad Nacional del Sur, designa Perito Institucional al autor de la presente comunicación. Para cumplir con lo solicitado se trasladaron a la Cátedra de Parasitología Clínica de la mencionada Universidad seis jamones interdicitados por la justicia. En el laboratorio se procede a individualizar cada pieza, respetando la numeración de los precintos, para luego efectuar exámenes triquinoscópicos directos y previa digestión enzimática (según técnica del Ministerio de asuntos Agrarios de la Provincia de Buenos Aires, Dirección de Desarrollo Agropecuario y Sanidad Animal, octubre, 1997). Se utiliza pepsina 1:10000. Se digieren cien gramos de músculo por jamón. Las muestras estaban muy deshidratadas y saladas. Los resultados obtenidos fueron: Triquinoscopias directas: todas negativas. Digestiones enzimáticas: tres negativas y tres positivas, con cargas parasitarias de: 0,03 larvas/gr; 0,1 larva/gr y 0,6 larva/gr. Con estos resultados se concluyó que, independientemente de que las cargas parasitarias fueran bajas, estos embutidos no estarían en condiciones de comercialización ya que de acuerdo con ordenanza municipal 1204-96 de esta ciudad, toda vez que en un alimento se detecte la presencia de larvas de *T. spiralis*, no se debe autorizar su comercialización. Es obligatoria la digestión enzimática. De todo lo actuado surge la importancia de que los municipios efectúen controles bromatológicos en la bocas de expendio mediante técnicas de digestión enzimática.

DG123. Utilización de PCR en líquido cefalorraquídeo (LCR) para el diagnóstico de meningoencefalitis chagásica. TEKIEL V, GONZÁLEZ CAPPAS M, ZALAC, CEROTTO M.

Dpto Microbiología, F. Medicina, UBA. parainmu@fmed.uba.ar

El objetivo del trabajo fue determinar la sensibilidad y especificidad de la PCR en LCR para realizar el diagnóstico

temprano de la etiología chagásica de meningoencefalitis (ME).

Se evaluaron muestras de LCR de 5 pacientes con diagnóstico serológico previo de enfermedad de Chagas y meningoencefalitis actual de diferentes etiologías: *Pac 1*: Inmunosuprimido (IS), VIH+, ME chagásica (parásitos en sedimento de LCR: positivo; inoculación de LCR en ratón: positivo). *Pac 2*: IS, VIH-, ME chagásica (parásitos en sedimento de LCR: negativo; inoculación de LCR en ratón: positiva). *Pac 3*: Inmunocompetente, ME por *S. pneumoniae* (cultivo positivo). *Pac 4*: IS, VIH-, sin ME, con Sde. febril prolongado y posterior diagnóstico de reactivación de CMV. *Pac 5*: IS, VIH+, ME por *T. gondii* (anatomía patológica).

Se extrajo ADN a partir de 100 ml LCR por el método de fenol-cloroformo; la PCR fue realizada con primers para la enzima HGPRT de *T. cruzi* y los productos obtenidos se detectaron en geles de agarosa 2% teñidos con BrEt. Se realizaron, además, diluciones sucesivas de parásitos, que se amplificaron por PCR con el mismo protocolo, para determinar el límite de detección de la técnica y semicuantificar la carga parasitaria en LCR de pacientes.

Sólo se detectó ADN parasitario en el LCR de pacientes con diagnóstico confirmado de ME chagásica (*Pac. 1 y 2*). La carga parasitaria se estimó en 6.25-3.125 par y 1.625-0.812 par/ 100 ml de LCR para los *Pac 1 y 2*, respectivamente. En pacientes con enfermedad de Chagas crónica y ME de otras etiologías la búsqueda de ADN de *T. cruzi* en LCR resultó negativa.

Estos hallazgos sugieren la posibilidad de utilizar PCR como una técnica alternativa rápida y de alta sensibilidad para el diagnóstico de reactivación de enfermedad de Chagas con localización en el Sistema Nervioso

DG124. Ocurrencia simultánea de señales positivas de parasitismo por PCR y pruebas serológicas negativas en infecciones murinas por *Trypanosoma cruzi*, atenuadas o tratadas con Benznidazol. SEGURA MA, NASSER JR, UNCOS A. Y BASOMBRIO MA.

Fac. de Cs. Naturales. LAPE, Fac. de la Salud. UNSa, Salta, Argentina. seguram@ciunsa.edu.ar

La Reacción en Cadena de Polimerasa (PCR) y los métodos serológicos inmunoenzimáticos son las técnicas más sensibles para detectar las infecciones crónicas por *Trypanosoma cruzi*. Con la intención de revelar infecciones subpatentes, responsables de la resistencia a reinfecciones se aplicaron estos métodos a ratones con infecciones atenuadas (inoculación con la cepa TCC) o curadas por benznidazol (BZL). Se estudiaron 5 grupos experimentales de ratones: 1) infectados con 10³ tripomastigotes virulentos de la cepa Tulahuén (n=6); 2) igualmente inoculados, pero durante un tratamiento con BZL (día -6 a -1: 200 mg/kg/d; día 0 infección; días -1 a +4: 400 mg/kg/d; día +5 a +14: 200 mg/kg/d (n=9); 3) inoculadas por vía i.p. con 10⁶ epimastigotes de cepa TCC (n=16); 4) inoculados con TCC y tratados (n=10) y 5) no infectados, con tratamiento (n=11). Al día 20 postinoculación se aplicaron hemocultivos a los animales, que resultaron todos positivos en el grupo 1 y todos negativos en los demás grupos. Al día 180 se obtuvo suero y se realizó la prueba ELISA, que dio resultados positivos (alto título) en todos los del grupo 1) y negativos en 18/19 ratones infectados y tratados (grupo 2 y 4). A los días 195 y 202 los animales se sangraron nuevamente, recolectando 700 µl de sangre de cada uno, que se procesó con una técnica PCR que amplifica segmentos constantes

de 330 p.b., cebada por los primers 121 y 122. Todos los animales del grupo 1 fueron PCR + y todos los del grupo 5, PCR -. Se encontró sorprendentemente, que en 13 de los 35 ratones de los grupos 2+3+4 (con infecciones atenuadas y/o tratadas) ocurrió el hallazgo (casi simultáneo) de PCR+ y serología - en el mismo animal. Se conciben, como hipótesis de trabajo, algunos mecanismos para la supresión de anticuerpos en animales parasitados o para la preservación de secuencias de DNA cinetoplástico parasitario en los animales "curados" con BZL.

DG125. Diagnóstico molecular de Chagas congénito: seguimiento de la respuesta al tratamiento parasiticida y cuantificación de la parasitemia. BURGOS J, ALTCHER J, LEVIN MJ, FREILIJ H, SCHIJMAN AG.

INGEBI-CONICET y Laboratorio de Chagas, Htal. de Niños R. Gutierrez, Bs. As. Argentina. jburgos@dna.uba.ar

Se estudiaron dos grupos de pacientes pediátricos, hijos de madres chagásicas, incorporando a los métodos de diagnóstico convencionales (microhematocrito, MH positivo en recién nacidos menores de 6 meses, Grupo I N=27 y dos ensayos serológicos positivos en niños mayores de 6 meses, Grupo II, N=54), un ensayo de PCR basado en la región variable del minicirculo de *T. cruzi*. En el Grupo I, el 100 %

de los MH+ fueron PCR+, con un caso MH- PCR+, confirmado por xenodiagnóstico, indicando que la PCR es una técnica parasitológica más sensible. En Grupo II, el 70% de los pacientes seropositivos resultaron PCR positivos indicando que la serología es el método diagnóstico de elección para este grupo. Los pacientes chagásicos fueron tratados con 10-15 mg/kg/día de Nifurtimox "Lampit" (Bayer) por dos meses. Se realizó seguimiento serológico y en los casos PCR+ iniciales, también PCR a los 2 y 6 meses. La PCR negativizó en el 86% en ambos grupos al fin del tratamiento y en el 100% en el control posterior. En el Grupo I la serología negativizó en un 33% al finalizar el tratamiento y en un 100% en el control posterior, mientras que en el Grupo 2, solo negativizó en un 7% de los casos en el control postratamiento. Por lo tanto la PCR podría funcionar como un marcador temprano de cura con respecto a la serología que permanece detectable por largos períodos, sobre todo en los chagásicos indeterminados. La caracterización de la infección en los pacientes con Chagas congénito se amplió mediante la cuantificación de equivalentes geonómicos por ml de sangre, representativos del nivel de parasitemia. Para esto se diseñó un método de PCR competitiva-cuantitativa (PCRQ) incorporando al ensayo de PCR un estándar interno clonado. La PCRQ mostró una parasitemia basal promedio de 8×10^3 equivalentes de parásitos/ml para el grupo I, y una parasitemia de 0.1×10^3 equivalentes/ml para pacientes del grupo 2 y madres chagásicas.

IN: INMUNOLOGÍA

IN126. Respuesta humoral específica generada en ovejas vacunadas con paramiosina contra la fasciolosis ovina. CANCELA M; CARMONA C, BASMADJIÁN I, CARAMBULA B, ACOSTA D, PIACENZA L, KOOYMAN* F AND BERASAIN P.

*Unidad de Biología Parasitaria, Instituto de Higiene, Facultad de Ciencias, Montevideo, Uruguay. *Instituto de Enfermedades Infecciosas e Inmunología, Facultad de Veterinaria, Universidad de Utrecht, Holanda.*

La paramiosina es una proteína miofibrilar presente únicamente en el músculo de vertebrados la cual fue empleada en ensayo de vacunación contra la fasciolosis en ovinos. La inmunización con paramiosina generó altos niveles de protección (57% , $P=0,0022$) y un importante efecto anti-reproductivo (89%; $P=0,066$). Con el fin de determinar la respuesta humoral específica contra la paramiosina, se analizaron por ELISA los sueros de animales inmunizados (grupo inmunizado) y no inmunizados (grupo control). Los resultados obtenidos muestran que todos los animales inmunizados desarrollaron una fuerte respuesta IgG contra la paramiosina de *F. hepatica* en comparación al grupo control. El mayor título IgG se observa 4 semanas después de la infección, aunque sólo se observa una correlación negativa entre carga parasitaria y título IgG a las 9 semanas post-infección. En el grupo control se observó una baja respuesta IgG específica contra la paramiosina a lo largo de la infección. Por otro lado la respuesta IgE fue medida como IgE total, IgE contra un extracto somático de *F. hepatica* e IgE específica contra la paramiosina de *F. hepatica*. No se observaron variaciones respecto al control en los animales inmunizados en lo que se refiere a los niveles de IgE es-

pecífica a lo largo de todo el experimento. En forma similar los niveles de IgE total no sufrieron variaciones significativas en ninguno de los dos grupos considerados.

IN127. Determinación de anticuerpos anti-F2/3 en pacientes con Chagas congénito. CORRAL RS, ALTCHER JM*, BIANCARDI M*, FREILIJ HL*.

*Lab. de Virología y *Lab. de Parasitología y Chagas, Hosp. de Niños R.Gutierrez, Buenos Aires, Argentina. jaltcheg@intramed.net.ar.*

La fracción antigénica F2/3 de tripomastigotes del *T. cruzi* contiene epitopes reconocibles por anticuerpos representativos de infección activa. Nuestro objetivo fue evaluar la cinética de estos anticuerpos en relación con la serología convencional (SC) en 20 pacientes con Chagas congénito. A todos ellos se les realizó SC (ELISA, HAI, Aglut. de partíc.) y anticuerpos contra F 2/3 por ELISA revelado por quimioluminiscencia, al diagnóstico y durante el seguimiento postratamiento (nifurtimox, 10-15 mg/kg/d. por 60 d.) hasta la negativización de SC. El antígeno F2/3 utilizado para las determinaciones fue purificado por extracción con solventes y cromatografía hidrofóbica según lo descrito por Almeida IC y col. (Biochem. J. 304:793-802, 1994). De acuerdo con el tiempo de negativización de SC, se dividieron los pacientes en 2 grupos: SC negativa <1 año postratamiento; edad al diagnóstico: X: 3 m.(15 d.- 8 m.); SC negativa >1 año postratamiento; edad al diagnóstico: X: 49 m. (1-120 m.). El grupo A negativizó la SC a los 6 m. +/- 4,2 y anti F2/3 a los 5 m. +/- 4,1. El grupo B negativizó la SC a los 60 m. +/- 37,6 y anti F2/3 a los 22 m. +/- 26,9. La negativización de anticuerpos anti F2/3 anticipó la SC negativa con mayor pre-

cocidad en el grupo B que en el grupo A ($p < 0,0001$). Estos datos preliminares apoyarían la utilidad de la determinación de anti F2/3 como marcador temprano de eficacia terapéutica en pacientes congénitos, particularmente en aquellos que tienen mayor tiempo de infección al inicio del tratamiento. Trabajo subsidiado por Fundación Alberto J. Roemmers

IN128. Reactividad del antígeno recombinante SAPA de *Trypanosoma cruzi* frente a sueros de perros de zonas endémicas para las enfermedades de chagasma y leishmaniasis. DAVIES C, CIMINO R, MARCO D, NASSER J y BASOMBRIÓ M.

Facultad de Cs Naturales y Lab. de Patología Experimental, Fac. de Cs de la Salud, Universidad Nacional de Salta, Salta, Argentina. cdavies@unsa.edu.ar.

El objetivo de este trabajo fue evaluar la capacidad del antígeno SAPA de *T. cruzi* para detectar infección chagásica en perros con lesiones compatibles con Leishmaniasis. Del departamento de Orán, Salta, zona predominantemente endémica para la Leishmaniasis, se analizaron 86 perros con lesiones compatibles con *Leishmania*, de los cuales 74 presentaban parasitología negativa y 12 parasitología positiva para dicha infección. Del departamento Chacabuco, Chaco, zona endémica para la enfermedad de Chagas-Mazza, se analizaron 50 perros, de los cuales 31 resultaron chagásicos por pruebas de ELISA con antígenos solubles de *T. cruzi* (HPTul) y el antígeno recombinante SAPA, demostrando una especificidad del 100% (tabla 1). En las pruebas de ELISA los sueros en dilución 1:500 fueron enfrentados a 0,5 mg de SAPA por pocillo, dilución de suero 1:500, IgG anti-dog biotinilado (Sigma) 1:2500 y conjugado (Sigma) avidina-biotina-peroxidasa 1:16000. Con esta técnica fue posible determinar que 2 sueros de perros con lesión eran también chagásicos, uno de los cuales era parasitológicamente positivo, sugiriendo en este caso una infección mixta. La especificidad para la prueba fue de 98% (programa Epidat 2.0), tabla 2.

Tabla 1

Serol.	Serología HPTul		
	(+)	(-)	
SAPA	31	0	31
	0	29	29
	31	29	60

Tabla 2

Serol.	Parasitología para Leishmaniasis		
	(+)	(-)	
Chagas	1	1	2
	11	73	84
	12	74	86

Planteamos la utilidad del antígeno SAPA como herramienta específica para detectar infección chagásica en perros con úlceras compatibles con Leishmaniasis. Subsidiado por el Consejo de Investigación de la UNSa

IN129. Clonado y expresión de una proteína P2 ribosomal de *Trypanosoma cruzi* con fines diagnósticos. DEKANTY A, CABEZA ML, MARCIPAR IS, MARCIPAR AJ, SILBER AM.

INTEBIO, Facultad de Bioqca. y Cs. Biológicas (UNL) Santa Fe, Argentina. adekanty@fcb.unl.edu.ar.

El diagnóstico de la infección por *Trypanosoma cruzi* presenta dificultades particularmente en áreas coendémicas con organismos relacionados tales como *Leishmania spp.* y *Trypanosoma rangeli*. El diagnóstico puede ser optimizado mediante el uso de antígenos definidos y bien caracteriza-

dos. En este sentido, los antígenos recombinantes son vistos como promisorios. El objetivo del presente trabajo fue el clonado, identificación y expresión de un antígeno recombinante de *T. cruzi* para la evaluación de su potencial utilidad en el diagnóstico de la infección. Para ello se caracterizó una mezcla de 140 sueros provenientes de pacientes infectados crónicos asintomáticos. Esta mezcla presentó un título por ELISA en placa de 12.800. En ensayos de Western blot, no se observaron diferencias en el reconocimiento de antígenos tratados y no tratados con un agente químico deglicosilante. Con esta mezcla de sueros se realizó el inmunorastreo de una biblioteca de expresión de ADNc proveniente de tripomastigotes de la cepa CL Brener. Se identificó y aisló un clon positivo, conteniendo un inserto de ADN de 450 pb. La secuencia nucleotídica reveló un marco abierto de lectura de 324 bp, codificante para un polipéptido de 107 aminoácidos. Por comparación en bases de datos se observó una homología con el grupo de las proteínas P2 ribosomales de *T. cruzi*. En estudios de inmunoblotting, anticuerpos purificados por inmunofinidad reconocieron dos bandas de aproximadamente 14 y 20 KDa sobre antígenos totales de epimastigotes y tripomastigotes. El fragmento de ADN obtenido fue subclonado en el vector de expresión pET32, lo cual permitió una expresión eficiente en *Escherichia coli*. Otros autores han observado que esta proteína induce la aparición de autoanticuerpos y se les ha atribuido a estos un rol en la patología cardíaca. Nuestros resultados preliminares indicarían la presencia de anticuerpos contra esta proteína en pacientes infectados sin sintomatología.

IN130. Caracterización de la infección por *Leishmania spp.* en el Chaco salteño: respuesta inmune humoral, infección doble con *T. cruzi* y especies de *Leishmania involucradas*. FRANK FM¹, FERNANDEZ MM¹, CAFFARO CE¹, CAJAL P², SOCCOL V³, TARANTO N², MALCHIODI EL¹.

¹IDEHU-Inmunología, FFyB, CONICET-UBA. ²Laboratorio de Enfermedades Tropicales, UNSa. ³Universidad Federal de Paraná, Brasil. emalchio@ffybu.uba.ar

Se estudiaron 450 pacientes de la zona del chaco salteño con lesiones compatibles con leishmaniosis. Se incluyeron en este estudio 330 con leishmaniosis confirmada por examen parasitológico directo en frotis y/o intradermorreacción de Montenegro (IDR) positiva. El 90% de los pacientes presentaron IDR positiva, con lesiones de hasta 73 mm. El 67,9% de los pacientes presentaba amastigotes en el frotis. Los sueros se estudiaron por IFI frente a epimastigotes y promastigotes y ELISA frente a Ag complejos de *T. cruzi* y *L. mexicana*. Para diferenciar serológicamente entre ambas parasitosis se realizó ELISA con el Ag163B6 e "immunoblotting" con epimastigotes de *T. cruzi*, donde los sueros de los pacientes chagásicos presentan bandas características. Como prueba confirmatoria de infección chagásica se utilizó PCR con el set de primers TCZ1/TCZ2 que permite amplificar ADN genómico del parásito. El 70,9% de los pacientes presentó reactividad positiva por IFI o ELISA para Chagas. Sin embargo, cuando se utilizaron los métodos específicos para diagnóstico de Chagas se comprobó que sólo el 42% estaban infectados. Se destaca que de los pacientes que no presentaron evidencia de infección chagásica por métodos específicos, el 29% hubieran sido diagnosticados como chagásicos al realizarse serología convencional, con todas las consecuencias que esto tiene desde el punto de vista social y económico. Si bien varios autores han señalado que las leishmaniosis cutáneas no

generan una fuerte respuesta humoral, nosotros observamos que el 80,5% de los pacientes sin evidencia de infección chagásica, presentó IFI o ELISA para leishmaniosis positivos.

Empleando 13 sistemas isoenzimáticos se realizó la tipificación de promastigotes obtenidos a partir del raspado de lesiones de 20 pacientes. Se comprobó que 17 eran *Leishmania (Viannia) braziliensis* y 3 *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. Esta última especie no ha sido reportada previamente en Argentina.

IN131. Antigenicidad de las proteínas Rop2 y Gra4 en infecciones toxoplásmicas humanas. NIGRO MG, TANOS T, GUTIERREZ A, MARTÍN V Y ANGEL SO.

Instituto Nacional de Parasitología Dr. Mario F. Chaben/ANLIS Dr. Carlos G. Malbran, Departamento de Parasitología Sanitaria, Buenos Aires, Argentina. sangel@anlis.gov.ar

En este trabajo se analizó el valor antigénico de dos proteínas recombinantes, rGra4 y rRop2, del *Toxoplasma gondii*. Ambas proteínas se expresan en *Escherichia coli* fusionadas a 6 residuos de histidinas. Se sensibilizaron placas de ELISA con rRop2 o rGra4 y se analizaron por IgG, IgA e IgM-ELISA 98 sueros humanos, los cuáles fueron divididos en tres grupos: 1. seronegativos (n= 20), 2. IgG+ (n= 48), 3. IgG/IgM y/o IgA+ (n= 30). El 89,7% de sueros de los grupos 2 y 3 mostraron IgG reactivas contra rRop2 mientras que el 60% de ellos lo mostraron para rGra4. En el grupo 1 un suero resultó reactivo para rRop2 y ninguno para rGra4. Se analizaron 10 sueros del grupo 2 y 10 del grupo 3 con títulos por inmunofluorescencia de 256 a 1024, y se compararon los valores de absorbancias. El resultado demostró que los sueros del grupo 3 presentaban diferencias significativas en los valores de absorbancia respecto a los del grupo 2. El 47% de los sueros del grupo 3 reaccionan contra rRop2 por IgA-ELISA y ninguno reaccionó contra rGra4. Los análisis de dichos sueros por IgM-ELISA demostraron que tanto rRop2 como rGra4 presentan bajos niveles de reacción (17,2% y 0% respectivamente). Se concluye que ambas proteínas recombinantes presentan un alto valor antigénico para detectar IgGs específicas, siendo rRop2 la de mayor valor. Asimismo, ambas proteínas recombinantes podrían utilizarse para diferenciar sueros provenientes de infecciones crónicas respecto de infecciones potencialmente agudas en base a los valores de absorbancias obtenidos por IgG-ELISA. Finalmente rRop2 es un interesante candidato para detectar inmunoglobulinas de fase aguda (IgA e IgMs) en combinación con otros antígenos de similares características.

IN132. Localization and distribution of microfilaria of *Wuchereria bancrofti* antigens recognized by antisera from microfilaricidal individuals. PEIXOTO CA*, ALVES LC*, SILVA LF*, ROCHA A#

**Deptº de Patologia e Biologia Celular e #Deptº de Parasitologia CpqAM (FIOCRUZ), Av. Moraes Rego s/n, Campus da UFPE, Recife, Brazil. cpeixoto@cpqam.fiocruz.br*

Lymphatic filariasis remains a major public health problem in tropical countries around the world. An estimated 120 million people are infected and more than 90% of them with *Wuchereria bancrofti*. In endemic areas, the clinical spectrum of lymphatic filariasis includes asymptomatic microfilariae carriers, subclinical lymphangiectasia, filarial acute

lymphangitis (FAL), chronic manifestations (adenopathy, lymphedema, hematuria, hydrocele, chylocele, chyluria) and tropical pulmonary eosinophilia (TPE).

Lymphatic filariasis has expanded focally in developing countries of tropical and subtropical regions. In Brazil, Belém and Recife are the main areas of intense filariasis transmission. The present paper aims to identify antigenic sites in microfilariae processed for electron microscopy and incubated with sera from non-symptomatic microfilaricidal patients from Recife endemic areas.

Ultrathin sections of resin-embedded microfilariae were incubated with sera from microfilaricidal patients with different microfilaricidal densities (1-100 mf/ml, 101-500 mf/ml and >1000 mf/ml). The sections were then rinsed in PBS and incubated for 1 hour with gold-labeled Protein A. The three groups studied presented reactivity when incubated with thin sections of microfilariae of *Wuchereria bancrofti*. The gold particles were homogeneously distributed in all microfilariae tissues. No antigen specific region was observed. However, there are differences in reaction intensity among the three groups studied such as the density of colloidal particles per square micrometer is inversely proportional to the microfilaricidal density. These results confirm data obtained by other authors and indicate a possible role of the humoral response in the destruction mechanism of circulating microfilariae. Supported by CPqAM, FIOCRUZ (PAPES II "A" 0250.250.318) & FACEPE.

IN133. Individuos adultos con exposición limitada a *Plasmodium falciparum* desarrollan anticuerpos a la proteína RESA. PÉREZ HA, MEDINA JD*, BOLÍVAR J, DE LA ROSA M.

*Centro de Microbiología; *Centro de Química, Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas, Caracas, Venezuela. hperez@pasteur.ivic.vz*

Los merozoitos de *P. falciparum* contienen una proteína de 155 kda, que en los jóvenes anillos se sitúa en la cara interna de la membrana plasmática del eritrocito. Esta proteína, referida como Pf155 o RESA, contiene dos regiones conservadas con secuencias repetidas en tandas de 3 subunidades diferentes: EENV, EENVEHDA (C-terminal) y DDEHVEEPTVA (N-terminal). Que referiremos como RESA4, RESA8 y RESA11. La evidencia experimental señala cualidades inmunológicas de RESA que justifican su inclusión en una vacuna contra la fase eritrocítica de *P. falciparum*. La inmunoepidemiología de RESA en zonas de malaria holo/hiperendémica de África, indica que los anticuerpos a RESA, particularmente contra RESA4, están relacionados con el descenso de la parasitemia y de la morbilidad, que ocurre en la población adulta. Presuntamente como consecuencia de varios años de exposición a la malaria. Tenemos escasa información sobre la respuesta inmune a RESA, que sucede en los individuos que procedentes de zonas no endémicas, se infectan con *P. falciparum* durante la vida adulta. Investigamos los anticuerpos contra RESA4, RESA8 y RESA11, en un grupo de 50 adultos quienes registraban entre 0 y 7 antecedentes de malaria por *P. falciparum*, acontecidos durante sus estadías de corta permanencia en las zonas selváticas del estado Bolívar (sur-este de Venezuela). Los péptidos RESA4, RESA8 y RESA11 fueron sintetizados en fase sólida con química F-moc, purificados y utilizados para evaluar los anticuerpos específicos mediante la prueba de ELISA. La respuesta a RESA11 se correlacionó con la ocurrencia de malaria. La tasa mayor de anticuerpos a RESA8 estuvo entre quienes tenían 2 o más antecedentes.

Aquella para RESA4 se encontró en los individuos con 4-7 antecedentes. Estos hallazgos se discutirán en el marco de las hipótesis actuales acerca de la influencia de la edad, la exposición al parásito y la modulación de la respuesta inmune a la malaria.

IN134. Seguimiento de la evolución de los anticuerpos en pacientes infectados por *Toxoplasma gondii*. RISSO M, OLIVARES L, MARCIPAR A, SILBER A, DALLA FONTANA ML, MARCIPAR I.

Instituto de Tecnología Biológica, Fac. de Bioquímica y Cs. Biológicas (Univ. Nac. Del Litoral) - Santa Fe, Argentina. mrisso@fbc.unl.edu.ar

Con el fin de evaluar criterios para determinar una infección aguda por *Toxoplasma gondii*, se obtuvieron muestras de suero a partir de dos pacientes infectados desde la fase sintomática hasta el establecimiento de la fase crónica de la infección (14 meses posteriores al comienzo de los síntomas). Se realizó un análisis detallado de la evolución del perfil de anticuerpos específicos en estos pacientes para anticuerpos totales (por AD), IgG (por IFI), IgM (por ISAGA y ELISA doble sandwich) e índice de avidez de IgG (mediante una técnica de ELISA modificada). Se realizaron además ensayos de western blot y western blot de avidez para estudiar la evolución en el tiempo, tanto de la presencia de anticuerpos contra antígenos individuales, como de su avidez.

En este trabajo se presentan los datos obtenidos en pruebas serológicas para el seguimiento realizado durante el curso de las dos infecciones. En los ensayos de Western blot se confirmó tal como se menciona en la bibliografía, la capacidad de un antígeno de 22 kDa de discriminar la fase aguda de la crónica para estos pacientes. Finalmente en los ensayos de Western blot de avidez se observó que antígenos de 70, 45, 22 y 21 kDa muestran un patrón de maduración de los anticuerpos similar para ambos pacientes, observándose que los anticuerpos son completamente eluidos en condiciones caotrópicas durante la fase aguda, mientras que se hacen progresivamente resistentes a la elución en estas condiciones a partir del cuarto mes desde la sintomatología. El seguimiento de la evolución de anticuerpos a lo largo de las dos infecciones evaluadas permitió establecer criterios para la discriminación de las fases aguda y crónica, sobre la base de los títulos de IgM por la técnica de ISAGA, de los antígenos parasitarios reconocidos en las distintas etapas de la infección y de los antígenos que desarrollan anticuerpos de baja avidez en la fase aguda de la infección.

IN135. Characterization of proteic extracts of *Rodentolepis nana*, *Syphacia obvelata* and *Aspiculuris tetraptera*.

¹GONÇALVES L, ²ALVES CR, ^{2,3}GIOVANNI-DE-SIMONE S, ²PANTOJA JR, ²GUEDES HLM, ¹PINTO RM, ¹GOMES DC

¹Laboratório de Helminthos Parasitos de Vertebrados, Departamento de Helminthologia. ²Laboratório de Bioquímica de Proteínas e Peptídeos, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular. Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil. ³Departamento de Biologia Celular e Molecular, Instituto de Biologia, Universidade Federal Fluminense, Niterói, RJ, Brasil. calves@gene.dbbm.fiocruz.br

Proteic extracts of *Rodentolepis nana* (=Hymenolepis nana), *Syphacia obvelata* and *Aspiculuris tetraptera* were resolved and compared by electrophoretic methods, gel

filtration high-performance liquid chromatography (HPLC), dot-blotting and Western blotting. By electrophoresis under denaturing conditions polypeptides were detected with similar molecular weights (30-42 and 50-66 kDa), for the three helminthes species. Conversely, specific polypeptides were observed as a band of 14 kDa in *S. obvelata*, 26 kDa in *A. tetraptera* and 6 kDa in *R. nana*. SDS-PAGE under non-denaturing conditions also revealed common bands of 23-30 kDa for the three investigated species and of 100, 80, and 56 kDa for *R. nana* and of 66 and 45 kDa for *A. tetraptera*. The immunogenicity and antigenicity of the extracts was confirmed by the dot-blot method, since they were able to induce immune response in rabbits. By Western blotting assay, it was observed a common but specific pattern of reactivity (ex: polypeptides of 66 kDa) and other single reactions in *A. tetraptera* (26 and 22 kDa) and *S. obvelata* (14 kDa). Interestingly, rabbit sera anti-*S. obvelata* and anti-*A. tetraptera*, revealed a similar pattern of reactivity of polypeptides of 96-100 kDa.

(Supported by FIOCRUZ, CNPq and FAPERJ).

IN136. Circulating antigens in experimental murine toxoplasmosis: tissue cyst antigens and tachyzoite antigens, including an immunoglobulin binding protein. VILLAVEDRA M, RAMPOLDI C, CAROL H, BAZ A, BATTISTONI JJ & NIETO A

Cátedra de Inmunología, Facultad de Química - Facultad de Ciencias. Universidad de la República, Montevideo, Uruguay.

In the present work we describe the identification of *T. gondii* circulating Ag in sera of Balb/c mice experimentally infected with the virulent RH strain, with the cystogenic WTD1 strain and with an isolate from a human patient. The circulating Ags were identified, by immunoblot, in tachyzoite (RH strain) and in tissue cyst (ME-49 strain) crude antigens, using Ab produced by immunisation of Balb/c mice with homologous sera from infected animals. The most relevant tachyzoite Ags identified are in the clusters of 109-94, 67-57, 35-31 and 28-21 kDa. Also tissue cyst specific circulating Ags, like the 18 kDa one, were detected in sera from mice infected with the cystogenic strains. The immune sera, after depletion of tachyzoite specific Ab, recognised 3 tissue cysts Ag with Mr of 120, 79 y 48 kDa, and a cluster of Ags in the range of 68-53 kDa. We produced mAb by fusion of myeloma cells with lymphocytes from the mouse immunised with RH strain circulating Ag. One of the obtained clones, named 3A11/H12, secretes IgG₁ and recognises a peptidic epitope from a tachyzoite 67 kDa protein. This parasite protein also binds irrelevant mouse IgG, as well as immunoglobulins from other species. The reactivity with non-specific Ab was inhibited by preincubation with 2% of mouse and goat normal serum, while the reaction with the mAb 3A11/H12 was not. Furthermore, a biotinylated F(ab)₂ of an irrelevant mouse IgG, did not show any reactivity while the F(ab)₂ of the mAb 3A11/H12 reacts specifically with the 67 kDa Ag suggesting that this molecule is a putative Fc binding protein.

IN137. Mimetismo molecular entre un péptido derivado de cruzipaina del *Trypanosoma cruzi* y miosina cardíaca de ratón. Análisis de la respuesta inmune. GUIÑAZÚ N, GIORDANENGO L, RIVAROLA W, GEA S.

Dpto. Bioq. Clínica. Fac. Cs. Químicas. Cátedra de Física Biomédica. Fac. de Medicina. UNC. Córdoba. Argentina. sgea@bioclin.fcq.unc.edu.ar.

La cardiopatía es una de las manifestaciones clínicas más severas de la enfermedad de Chagas producida por la infección con *T. cruzi*. Previamente demostramos que la inmunización de ratones con cruzipaina (Cz), un importante inmunógeno del parásito, es capaz de inducir una fuerte respuesta humoral y celular contra el inmunógeno, pudiendo controlar parcialmente la parasitemia en el período agudo de la infección. Además, anticuerpos de diferentes isotipos y células T reactivas con miosina cardíaca de ratón (Mc) fueron detectados en los ratones inmunizados. Acs. anticruzipaina purificados por inmunoabsorción, reconocieron Mc por western blot. Esta respuesta se asoció con alteraciones ultraestructurales y electrocardiográficas. Con el propósito de identificar epitopes de Cz y Mc involucrados en la inmunidad protectora o patogénica, la respuesta inmune hacia péptidos sintéticos de 12 aa derivados de Cz (PCz) 291-302 y de miosina (PMc) 6-17, los cuales comparten homología, fue estudiada en ratones y los registros electrocardiográficos fueron obtenidos. Grupos inmunes fueron inyectados i.d con 3 dosis quincenales de 10µg/dosis/ratón, con PCz (GPCz, n=6) o con PMc (GPMc, n=6) más adyuvante de Freund completo (CFA). El grupo control (GC) fue inyectado con ovalbúmina más CFA. Sangrías de cada grupo de animales fueron obtenidas después de la inmunización cada 14 días, para ensayar la reactividad de los Acs. contra cruzipaina y contra Mc por western blot. La respuesta proliferativa de células de bazo cultivadas con PMc, PCz, Cz, Mc y concanavalina A, fue ensayada mediante la incorporación de timidina tritiada a distintos tiempos después de la última inmunización. Se observó respuesta proliferativa, a los 14 y 42 días post 3° inmunización, frente a PMc, PCz y Mc en el GPCz, en cambio, el GPMc solo fue capaz de proliferar con Mc. La mayor reactividad de los anticuerpos se observó a los 28 y 42 días después de la tercera inmunización. Los resultados indican que el PMc de 12 aa induce Acs. que se unen no solo a Mc sino también a cruzipaina (6/6). Por el contrario, suero de ratones inmunizados con PCz fueron capaces de reconocer Cz (4/6) pero no Mc. El análisis de los estudios electrocardiográficos no reveló alteraciones en el sistema de conducción cardíaca en los grupos inmunes. En resumen, el péptido de Mc 6-17 que comparte homología con un segmento de Cz, induce Acs de reacción cruzada no patogénicos sugiriendo que el mimetismo molecular entre los dos péptidos ensayados no es condición suficiente para generar el daño cardíaco.

IN138. Un anticuerpo monoclonal generado contra un epítipo inmunodominante de la proteína ribosomal TcP2b de *T. cruzi* interactúa con el receptor β 1-adrenérgico. MAHLER E*, SEPULVEDA P*, GHIO S*, HOEBEKE J#, LEVIN MJ*, HONTBEYRIE M#.

*INGEBI-CONICET (Bs As, Argentina), #Inst.Pasteur, (Paris, Francia), *UPR9021 du CNRS, (Strasbourg, Francia). emahler@dna.uba.ar

Se ha demostrado que anticuerpos de pacientes con cardiomiopatía crónica chagásica (CcCh) contra las proteínas ribosomales P de *T. cruzi* reaccionan en forma cruzada con receptores cardiovasculares. Para profundizar en estos estudios, se generaron anticuerpos monoclonales contra la proteína ribosomal recombinante TcP2 β de *T. cruzi*. Uno de los monoclonales obtenidos está dirigido contra la región C-terminal de la proteína y el mapeo epitópico confirmó que reconoce un epítipo inmunodominante (R13) que a

su vez es reconocido por sueros de pacientes chagásicos. Por técnicas de microscopía electrónica y western blot se demostró que el anticuerpo monoclonal reconoce proteínas del parásito y también humanas aunque con mucha menor intensidad. Mediciones por plasmón de resonancia en superficie confirmó que la afinidad por la proteína ribosomal humana fue en un orden de cinco veces menor que por la proteína ribosomal del parásito. Dado que el epítipo contiene una secuencia ácida que también se halla presente en el 2do dominio extracelular del receptor β 1-adrenérgico, se midió la actividad biológica del anticuerpo sobre un cultivo de cardiomiocitos de rata. El anticuerpo monoclonal demostró tener un efecto de tipo agonista similar al de las fracciones IgG de algunos pacientes con CcCh. En experiencias de transferencia pasiva en ratones, se observaron alteraciones electrocardiográficas luego de 30 min. de inyectar el anticuerpo por vía sanguínea, las que se acentuaron a tiempos más prolongados. Estos resultados confirman las implicancias patogénicas de anticuerpos que se generan contra la proteína ribosomal del parásito y reaccionan en forma cruzada con el receptor β 1-adrenérgico.

IN140. Actividad fagocítica de leucocitos de ratas Sprague-Dawley, infectadas experimentalmente con *Trypanosoma evansi*. BOHER Y⁽¹⁾, BOADA-SUCRE A^(1,2), DE STEFANO H^(1,2), ROSSI MS^(2,3)

⁽¹⁾ Universidad Nacional Experimental Simón Rodríguez, IDECYT-CEBIV. Caracas, Venezuela. ⁽²⁾ Universidad Central de Venezuela, Facultad de Ciencias, Postgrado de Zoología. ⁽³⁾ Dpto. Ciencias Morfológicas, Esc. José María Vargas, Fac. de Medicina, UCV. alboada@hotmail.com

Los modelos murinos han sido utilizados eficazmente para el mantenimiento de cepas de *Trypanosoma evansi* a través de pases consecutivos. Desde el punto de vista inmunológico se ha encontrado que el mecanismo de fagocitosis involucrado en el control de la parasitosis asociadas a diversas especies de *Trypanosomas* está mediado por anticuerpos de tipo IgM e IgG. Sin embargo se ha reportado la existencia de mecanismos de destrucción de parásitos en ausencia de anticuerpos para la especie *Trypanosoma cruzi*. El objetivo del presente trabajo es determinar la existencia de actividad fagocítica de los leucocitos, en el torrente sanguíneo de ratas infectadas con *T. evansi*, durante la fase aguda de la enfermedad. Para ello se realizó la infección experimental mediante la inyección intraperitoneal de *T. evansi* en ratas de la cepa Sprague-Dawley. Una vez alcanzada la fase terminal de la infección, los animales fueron sangrados por punción cardíaca, posteriormente mediante centrifugación se aisló la banda de leucocitos y parásitos, esta última fue procesada mediante técnicas convencionales de Microscopía Electrónica de Barrido. Los resultados demuestran la adherencia y agregados formados por numerosos parásitos adheridos a células blancas, además se observa fagocitosis de *Trypanosoma evansi* por los leucocitos en sangre de ratas. Demostrándose así, morfológicamente la existencia de fagocitosis mediada por la primera línea de defensa o inmunidad innata de ratas, sin embargo, esta respuesta no es efectiva para controlar la infección. Estos resultados constituyen la primera evidencia mediante Microscopía Electrónica de Barrido sobre la ocurrencia de este fenómeno con poblaciones venezolanas de *T. evansi*, sentándose las bases para posteriores estudios que se adelantan en el laboratorio.

IN141. Inducción de aplasia tímica por la trans-sialidasa de *Trypanosoma cruzi*. MUCCI J, CAMPETELLA O & LEGUIZAMÓN MS*.

*Laboratorio de Inmunología, Instituto de investigaciones biotecnológicas (IIB), Universidad de General San Martín (UNSAM); *Dpto de Microbiología, Fac. Medicina (UBA) Buenos Aires, Argentina. jmucci@iib.unsam.edu.ar*

Durante la etapa aguda de la infección, *Trypanosoma cruzi* induce profundas alteraciones en el sistema inmune. Entre ellas se encuentra la inducción de aplasia tímica, donde de la población afectada es la CD4+CD8+. Numerosos estudios han involucrado al ácido siálico en la maduración y en la activación linfocitaria. La trans-Sialidasa (TS) de *T. cruzi* es una enzima capaz de transferir residuos de ácido siálico entre macromoléculas del huésped y el parásito. Recientemente hemos demostrado que puede inducir apoptosis in vivo en células del sistema inmune. En este reporte comunicamos que la administración endovenosa de TS recombinante en sucesivas dosis (3 dosis durante 1 semana) induce aplasia tímica con una disminución de la celularidad cercana al 70%. Estudios de citometría de flujo indican que la población afectada es la D4+CD8+ como lo observado en la infección experimental. Este efecto es dependiente de la actividad enzimática ya que la administración de un recombinante de TS enzimáticamente inactivo no produce las alteraciones mencionadas. Por otro lado, timocitos tratados con TS activa in vitro mostraron un incremento significativo de apoptosis, con respecto a los controles. Podemos concluir que la movilización de residuos de ácido siálico en moléculas del hospedador por acción de la TS es un factor importante en la patogenia de la enfermedad de Chagas.

IN142. Inducción de activación alternativa de macrófagos normales a través de antígenos derivados del *T. cruzi*. STEMPIN C, GIORDANENGO L, GEA S, CERBÁN F.

Depto Bioq. Clín. Fac. Cs. Qcas. Univ. Nac. Cba. Argentina. fcerban@bioclin.fcq.unc.edu.ar.

Las interacciones entre macrófagos (M ϕ) y el *T. cruzi*, como así también el balance de citoquinas que se genera, pueden ser cruciales para comprender los mecanismos básicos de activación de M ϕ por parte de antígenos (Ags) parasitarios. El IFN- γ y el LPS median la activación del M ϕ por la vía clásica, cuya molécula efectora es el óxido nítrico. La IL-4 y los glucocorticoides inducen en el M ϕ activación alternativa, siendo la arginasa la molécula efectora más importante. El objetivo de este trabajo fue estudiar las vías de activación del M ϕ al interactuar con el *T. cruzi* o Ags parasitarios. Para ello se utilizaron como Ags: 1) cruzipaina (Cz), 2) R13: péptido carboxilo terminal de las proteínas ribosomales P1 y P2 del *T. cruzi*, 3) LPS. Como fuente de M ϕ : 1) línea celular de M ϕ murinos, J774, 2) M ϕ peritoneales de ratones normales (RN) y 3) M ϕ de bazo de RN. La activación de M ϕ por la vía clásica sólo se logró en presencia de LPS y no fue potenciada ni por Cz ni por R13, sugiriendo que estos Ags no serían buenos inductores de esta vía. Esto se comprobó a través de la determinación de óxido nítrico y de IL12 en los sobrenadantes de cultivos, ambos análisis dieron resultados negativos. En cambio, se detectó actividad de arginasa en los lisados de M ϕ de las distintas fuentes incubadas con Cz, como así también en M ϕ de bazo de ratones infectados con *T. cruzi*. R13 sólo indujo actividad de arginasa en células J774. También se observó la presencia de IL10 en los sobrenadantes de cultivos de M ϕ peritoneales en presencia de Cz. Cuando se estudió la ex-

presión de CD23, CD32 y CD16 por Citometría de Flujo (CF) en células J774, ni Cz ni R13 lograron modificar la expresión basal de tales receptores. Por otro lado el estudio por CF de la inducción de moléculas coestimuladoras (B7.1=CD80 y B7.2=CD86) en M ϕ de bazo reveló que Cz y en menor grado R13 indujeron la expresión preferencial de B7.2 a diferencia de LPS que indujo también la expresión de B7.1. Estos resultados sugieren que Cz podría, al interactuar con M ϕ de RN, condicionar la respuesta inmune, a través de la inducción de una vía metabólica preferencial con aumento de actividad de arginasa, expresión de B7.2 y liberación de IL10, favoreciendo un perfil TH2.

IN143. Co-expresión de MHC clase II y moléculas de coestimulación por células presentadoras de Ag en un modelo murino de infección aguda por *Trypanosoma cruzi*. ALBA SOTO C, MIRKIN GA, GONZÁLEZ CAPPÀ SM.

Depto. Microbiología, Parasitología e Inmunología, Fac. Medicina, UBA. smgcappa@fmed.uba.ar.

Analizamos la co-expresión de MHC clase II (I-E^k) y moléculas de co-estimulación (CD24, CD40, CD80 y CD86) en células dendríticas (CD11c+) y linfocitos B (CD19+) esplénicos y macrófagos (Mac-3+) peritoneales, mediante citometría de flujo, en ratones C3H/HeN infectados con las cepas RA ó CA-I (clon K98) de *T. cruzi* y controles. La expresión de I-E^k (mfi) aumentó en macrófagos y linfocitos B, pero no en células dendríticas de ratones infectados con ambas cepas. Sólo los ratones infectados con K98, presentaron aumento en la proporción de macrófagos que co-expresan I-E^k y CD80 o I-E^k y CD86 (p < 0,01). No observamos cambios en el porcentaje de linfocitos B y células dendríticas que co-expresan I-E^k y las moléculas de coestimulación analizadas, en los tres grupos de ratones estudiados. El número de células totales de bazo y exudado peritoneal fue mayor (p < 0,05) en la infección con RA comparada con K98 y controles. El porcentaje de macrófagos peritoneales fue mayor para K98 (p < 0,05), y menor para RA (p < 0,05), con respecto a los controles. El porcentaje de linfocitos B en ratones infectados con RA, pero no con K98, se mostró disminuido (p < 0,01). Concluimos que: 1) La deficiencia en la inducción de co-expresión de MHC clase II y CD80/CD86 en ratones infectados con RA (y a la mayor velocidad de replicación de esta cepa comunicada previamente), serían responsables del control ineficaz de la parasitemia por parte del huésped. 2) El aumento en la co-expresión de MHC clase II y CD80/86, en macrófagos de ratones infectados con K98, refleja una adecuada activación de esas células que, asociada a la lenta multiplicación parasitaria, explicaría su pasaje a la cronicidad. 3) El mayor número de macrófagos peritoneales, en ratones infectados con K98 con respecto a RA, sugiere un reclutamiento más eficiente de éstas células hacia los sitios de estimulación antigénica.

Financiado por: FONCYT y UBACYT.

IN144. Association between HLA type and antibody response to the CS protein repeats of *P. malariae*, *P. vivax* and *P. vivax* variants in individuals from endemic areas of Rondonia State (Brazil). OLIVEIRA-FERREIRA J¹; PRATT-RICCIO LR¹; ARRUDA M²; SANTOS F³; GOLDBERG AC⁴ & BANIC DM¹.

¹Department of Immunology, IOC, RJ, Brazil; ²Aggeu Magalhães Institute, RE, Brazil; ³FNS, Porto Velho, Brazil; ⁴ INCOR, SP, Brazil. riccio@gene.dbm.fiocruz.br, banic@gene.dbm.fiocruz.br

The circunsporozoite (CS) protein of the infective sporozoite stage has been a major target for a malaria vaccine. The repeat regions of the CS protein show little variation among isolates of the same species, except for *Plasmodium vivax*, in which 3 different sequences (VK210, VK247 and *P. vivax*-like) have been identified. In Brazil, antibodies to the CS protein of all 3 variants have been detected in serum samples from indigenous populations and in individuals from different malaria endemic areas. In this study human leukocyte antigens (HLA) were used as genetic markers in an attempt to determine possible genetic control of immunological responsiveness to the CS protein of *P. malariae*, *P. vivax* and its variants. HLA-DR type was determined for 108 donors, frequently exposed to malaria infection, living in rural areas of Porto Velho, and 77 donors of living in downtown Porto Velho, an area considered free of transmission. Sera from these individuals were tested by ELISA for antibodies against synthetic peptides corresponding to the repeats of the CS protein of *P. vivax*: *P. vivax*/VK210, *P. vivax*/VK247, *P. vivax*-like and *P. malariae*. The frequencies of individuals responding to CS repeat regions were 33%, 24%, 34% and 34% from the individuals living in rural areas and 1%, 6%, 3% and 8% from the individuals living in downtown Porto Velho for *P. vivax*/VK210, *P. vivax*/VK247, *P. vivax*-like and *P. malariae*, respectively ($P < 0.05$; for all). HLA typing of all studied individuals allowed us to observe that rural and urban groups exhibited no significant differences in HLA antigen frequencies. Moreover, significant associations between response to *P. vivax*/VK247 and the presence of HLA-DR16 was observed ($\chi^2 = 4763$; $P < 0.025$). Thus, as naturally-exposed individuals with different class II HLA antigens seem to respond differently to CS *P. vivax*/VK247 protein, this may have important consequences for subunit vaccine development.

IN145. Leishmaniosis visceral canina: Inmunidad celular en hígado de perros sintomáticos y asintomáticos.
DÍAZ NL, ZERPA O, PONCE LV, TAPIA FJ.

Instituto de Biomedicina, Universidad Central de Venezuela, Apartado 4043, Caracas 1010A, Venezuela. : ftapia@telcel.net.ve

El perro es un eslabón importante en la cadena de transmisión de la leishmaniosis visceral, con una alta morbilidad y numerosos animales sin manifestaciones clínicas. La comprensión de los mecanismos inmunológicos en estos animales, es fundamental para el entendimiento y control de la enfermedad. En este trabajo se evaluaron diferentes poblaciones de células inmunocompetentes, mediante inmunohistología sobre cortes congelados hígado de perros (n=49) sintomáticos (n=14) y asintomáticos (n=35), infectados en forma natural con *L. infantum* (*L. chagasi*) en la Isla de Margarita, Venezuela. Se evaluaron linfocitos T totales Thy-1+, T activados CD18+, T cooperadores CD4+, T citotóxicos CD8+, macrófagos MoMa+ y células dendríticas CD1a+ y CD11c+, la molécula de adhesión CD44 y la presencia del parásito. Los perros asintomáticos presentaron granulomas hepáticos con numerosos linfocitos T CD4+ ($2527 \pm 121 \text{ cel/mm}^2$) y CD8+ ($2121 \pm 172 \text{ cel/mm}^2$), mientras que los perros sintomáticos exhibieron una densidad menor de linfocitos T CD4+ ($600 \pm 40 \text{ cel/mm}^2$) y T CD8+ ($511 \pm 50 \text{ cel/mm}^2$). Las células presentadoras de antígeno se observaron dispersas en todo el parénquima hepático en ambos grupos, y la presencia de linfocitos T memoria CD18+ o CD44+ se observó en todo el infiltrado celular y el epitelio de los conductillos biliares. La disminución de poblaciones celulares

inmunocompetentes en los animales sintomáticos está relacionada con procesos de anergia selectiva que genera inmunosupresión, favoreciendo la proliferación y expansión tisular del parásito. Financiado por CONICIT S1-98000041, CDCH-UCV, Proyecto INCO-ERBIC18CT970213 de la Comunidad Europea y Proyecto 021-025 VEN/96/02-021-025.

IN146. Óxido nítrico e inmunidad celular en ratones susceptibles y resistentes a la infección por *Leishmania mexicana*. FERNÁNDEZ M*, FIGUEIRA E*, DÍAZ NL, RAMÍREZ R, MONSALVE I, TAPIA FJ. *Igual contribución.

Instituto de Biomedicina, Universidad Central de Venezuela, Apartado 4043, Caracas 1010A, Caracas Venezuela. ftapia@telcel.net.ve.

En modelos murinos se ha demostrado que el óxido nítrico (ON) juega un papel importante como mecanismo efector en la eliminación del parásito *Leishmania*. En este trabajo se evaluó la producción local y sistémica de ON, relacionándola con el tipo de respuesta inmunitaria celular, en un modelo murino de leishmaniosis cutánea americana. Ratones BALB/c susceptibles y C57BL/6 resistentes fueron infectados con *L.(L.) mexicana* (MHOM/BZ/1982/BEL21) y evaluados el tamaño de la lesión, el volumen del bazo y ganglio linfático popliteo durante 12 semanas. El ON se determinó indirectamente en suero, mediante el método de Griess, y en las lesiones, por inmunolocalización de la enzima óxido nítrico sintetasa inducible (iNOS). También se evaluó la población de células de Langerhans (CL), y la producción de IL-4 e IFN- γ , por el método Avidina-Biotina-Inmunoperoxidasa. Resultados: La producción de ON local y sistémico fue mayor ($p \leq 0,05$) en ratones resistentes durante las primeras etapas de infección. Los ratones resistentes son capaces de resolver espontáneamente la lesión, desarrollando respuesta inmunitaria con predominio de células INF- γ + ($3444 \pm 143 \text{ cel/mm}^2$) en relación con la IL-4+ ($1833 \pm 239 \text{ cel/mm}^2$). En contraste, los ratones susceptibles desarrollaron lesiones crónicas y progresivas con predominio de células IL-4+ ($4231 \pm 305 \text{ cel/mm}^2$) frente a las INF- γ + ($1361 \pm 152 \text{ cel/mm}^2$). El tamaño de la lesión y peso de ganglio linfático siguieron un mismo curso en el tiempo. La alta densidad de CL y la producción de ON en las etapas tempranas de la infección, se relaciona con el tipo de respuesta inmunitaria Th1, contribuyendo con la resolución de la enfermedad en los ratones resistentes a *L.(L.) mexicana*. Financiado por la UNDP/World Bank/WHO Special Programme for research and training in tropical Disease, CONICIT S1-98000041, CDCH-UCV y Proyecto INCO-ERBIC18CT970213 de la Comunidad Europea.

IN147. Cruzipaina incrementa las células CD19+, Mac-1+ y Gr-1+ e induce la activación de arginasa en macrófagos de bazo de animales inmunizados. GIORDANENGO L, GUIÑAZÚ N, FRETES R, STAMPIN C, CERBAN F, GEA S.

Dpto. de Bioquímica Clínica, Fac. Cs. Químicas; Instituto de Biología Celular, Fac. Cs. Médicas, UNC. sgea@bioclin.fcq.unc.edu.ar

Previamente demostramos que cruzipaina (Cz), principal inmunógeno del *T. cruzi*, induce respuesta autorreactiva hacia miosina de músculo esquelético y cardíaco acompañada de alteraciones funcionales y estructurales en ambos tejidos. Los bazos de animales inmunizados presentaron esplenomegalia como consecuencia de un aumento signifi-

cativo de su celularidad. El objetivo de este trabajo fue caracterizar las poblaciones celulares de bazo de ratones inmunizados con Cz a distintos tiempos post inmunización, realizar el estudio histológico de estos órganos, evaluar el perfil de citoquinas producidas por células de bazo estimuladas con Cz y estudiar las vías de activación del macrófago. Ratones BALB/c de dos meses de edad fueron inyectados *i.d.* con 3 dosis quincenales de 10 ug/dosis/ratón: Grupo Inmune (GI) con Cz más adyuvante de Freund completo y Grupo Control (GC) con ovalbúmina emulsionada en el mismo adyuvante. El análisis cinético de la expresión de los marcadores celulares en células de bazo estudiado por citometría de flujo reveló un marcado cambio en las distintas poblaciones del GI a los 14 días post 3ª inmunización. Los índices obtenidos (Nº de células con marcador positivo del GI/ Nº de células con marcador positivo del GC) fueron para CD19⁺=1,7; para Mac-1⁺=5,4 y para Gr-1⁺=6,0. La histología de los bazos del GI obtenidos en el mismo tiempo evidenció una expansión de células inmaduras de la serie mieloide. Al analizar por ELISA las citoquinas en sobrenadantes de cultivo se detectó que las células de bazo del GI estimuladas con Cz liberan altos niveles de IL-4, IL-5 e IL-10 y bajos niveles de IFN- γ e IL-12. Macrófagos provenientes de bazo de ratones del GI presentaron una elevada actividad de la enzima arginasa. Cruzipaina aumenta el número de células CD19⁺, Mac-1⁺ y Gr-1⁺, genera un perfil de citoquinas del fenotipo Th2 y produce activación del macrófago por vía alterna. Este mecanismo podría ser empleado por el *T. cruzi* para evadir la respuesta inmune del huésped.

IN148. Early *in vitro* priming of distinct CD4 T cell subsets determines polarized growth of *Leishmania chagasi*.
GOMES NA, BARRETO-DE-SOUZA V. & DOS REIS GA.

Laboratorio de Biología Inmunitaria, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, UFRJ, Rio de Janeiro, Brazil. nitza@biof.ufrj.br

An *in vitro* priming system (PIV) of murine naïve splenocytes was established to investigate early immune responses to *Leishmania chagasi*, the agent of visceral leishmaniasis in the New World. Priming of splenocytes from resistant or susceptible mice with *L. chagasi*, resulted in blast transformation and in proliferating parasite-specific CD4⁺ T cells secreting a differential complement of cytokines (IFN- γ and low IL-10 levels for resistant T cells; IFN- γ , IL-4 and high IL-10 levels for susceptible T cells). After priming, intracellular parasite load was much higher in susceptible than in resistant-type splenocyte cultures. Moreover, when early CD4⁺ T-cell priming in splenocyte cultures was disrupted with anti-CD4 mAb, polarized parasite growth was abolished, becoming comparable in resistant and susceptible cultures. Neutralizing IL-4 activity during the PIV, did not affect the final parasite load in susceptible cultures. However, neutralizing IL-10 activity markedly decreased parasite load in susceptible, but not in resistant splenic macrophages. Together, these results indicate that innate control of growth of a *L. chagasi* in splenic macrophages results from the ability to activate different CD4⁺ T-cell subsets.

IN149. Análisis cuantitativo de linfocitos T periféricos productores de IFN- γ en respuesta a péptidos de *Trypanosoma cruzi* en pacientes chagásicos crónicos. LAUCELLA SA, HUBBY B, ALBAREDA C, CLARK R, PRADO N, TARLETON RL, POSTAN M.

Instituto Nacional de Parasitología Dr. M Fátala Chabén, ANLIS Malbrán, Buenos Aires, Argentina y Department of Cellular Biology, University of Georgia, USA. mpostan@mail.retina.ar

El control de la infección por el *T. cruzi* depende principalmente de una fuerte respuesta humoral y de una respuesta celular T colaboradora y citotóxica, con perfil de secreción de citoquinas de tipo 1. En este trabajo se evaluó la respuesta inmune celular T CD8⁺ de pacientes chagásicos crónicos hacia péptidos de *T. cruzi* candidatos para el desarrollo de una vacuna, los cuales presentan alta afinidad de unión al HLA-clase I, A2, ampliamente representado en las áreas endémicas de América Latina. Para determinar la frecuencia de células productoras de IFN- γ específicas para los péptidos ensayados se empleó la técnica de ELISPOT, a partir de linfocitos periféricos aislados de 12 pacientes chagásicos crónicos y de 4 individuos no infectados HLA-A2⁺ como controles.

Los resultados mostraron que: el 75% de los pacientes fueron positivos para las proteínas de unión al calcio CaBP 6, 8 y 10; el 60% de los pacientes fueron positivos para los antígenos derivados de amastigotes y tripomastigotes ASP-1, ASP-2 y TSA-1; y finalmente un 42.8% positivos para LyT-1 2, 3, 4, 7 y 10. Todos los individuos no infectados resultaron negativos. Los ELISPOT realizados luego de la expansión de linfocitos con los péptidos de *T. cruzi* *in vitro* mostraron un aumento en la frecuencia de células productoras de IFN- γ al ser enfrentados con péptidos de *T. cruzi* solamente, no modificándose con péptidos derivados del HIV, corroborándose de esta manera la especificidad de la respuesta. Estos resultados demuestran la utilidad de la técnica ELISPOT para la identificación de epitopes T relevantes en proteínas de *T. cruzi* potencialmente inmunogénicas.

Financiación por MSyAS de Argentina y NIH/1 PO 1 A144979-01, USA.

IN150. Una proteína de 33kDa de *T. cruzi* induce activación policlonal de células B murinas normales e incrementa la expresión de moléculas coestimuladoras como B7.2 y antígenos clase II del CMH. MONTES C¹, ZUÑIGA E¹, VAZQUEZ J², GRUPPI A¹.

¹Dpto de Bioquímica Clínica, Fac de Cs Químicas, UNC, Córdoba, Argentina; ²Centro de Biología Molecular Severo Ochoa, Universidad Autónoma de Madrid, Madrid, España. agruppi@bioclin.fcq.unc.edu.ar.

Previamente demostramos que una proteína de 33kDa (p33) obtenida de una fracción alcalina del citosol de epimastigotes del *T. cruzi*, es capaz de inducir activación policlonal de linfocitos (Li) B murinos normales en forma T-independiente. P33 se obtuvo en forma preparativa a partir de F105 (sobrenadante del citosol de epimastigotes de *T. cruzi* centrifugado a 105000 g) por cromatofocado utilizando un buffer de intercambio 94 que cubre un rango de pH 6-9. Posteriormente en LiB estimulados con p33 analizamos la expresión de moléculas coestimuladoras y de Ags clase II del CMH. Para ello en células de bazo de ratones normales se eliminó la población de Li T por medio Acs anti-Thy1.2 adosados a perlas magnéticas y la población obtenida enriquecida en LiB fue cultivada en presencia o ausencia de p33 durante 72 hs. Por FACS observamos que en LiB estimulados con p33 se detectó un 35% de LiB B7.2⁺ y un 90% de LiB CMH-clase II⁺. Cuando los Li fueron cultivados sin estímulo el % de LiB B7.2⁺ y CMH-clase II⁺ fue 20% y

68% respectivamente. También observamos que p33 incrementa la expresión de B7.2 dado que la media de intensidad de fluorescencia fue 1737 vs 1565 detectada en LiB controles. Además observamos que p33 estimula la proliferación de LiB con baja expresión de B7.1. Para conocer la secuencia de aminoácidos de p33, la proteína purificada fue sometida a digestión triptica y los péptidos obtenidos fueron analizados por espectrometría de masa. La búsqueda de homología de los péptidos se realizó con la base de datos SWISSPROT. Este estudio reveló que la mayoría de los péptidos secuenciados presentan alta homología (75-100%) con una oxidoreductasa de *E.coli* miembro de una familia de aldo/ceto reductasas. Estos resultados permiten concluir que p33, una proteína que no ha sido previamente descrita en *T.cruzi*, probablemente una oxidoreductasa, induce activación policlonal de LiB en forma T-independiente y contribuiría a mejorar la capacidad presentadora de Ag del LiB.

IN151. Producción de FNT- α y NO en macrófagos peritoneales (MP) de rata infectados con *Trypanosoma cruzi*. Influencia de la edad del huésped. PASCUTTI MF, BOTTASSO O, REVELLI S.

Inst. de Inmunología. Fac. Cs. Médicas (UNR) Rosario, Argentina. revelli@arnet.com.ar.

Estudios previos indican que la infección con *T.cruzi* en ratas adultas -A- (70-120 días) da lugar a una enfermedad aguda de escasa jerarquía, no así cuando se las infecta al destete -D- (Medicina 47:360, 1987). La menor severidad de la infección aguda de las ratas A no se acompaña de una mayor capacidad de los macrófagos "no estimulados" para la eliminación del parásito y síntesis de mediadores comprometidos en tal evento (Medicina 59:639, 1999). Nuestro objetivo fue determinar si esta distinta susceptibilidad a la infección *in vivo* se debía a un comportamiento diferente de los macrófagos "activados" frente a los tripomastigotes. Se obtuvieron MP de ratas A y D que tras 18 hs de incubación (medio Earle's MEM suplementado con 10% de SFB) fueron expuestos al *T.cruzi* (relación parásito:célula 0.5:1, 1:1 y 5:1), en presencia de IFN γ (400 y 2000 U/ml) durante todo el estudio, para realizar a las 24 y 48 hs post-exposición el recuento de parásitos en sobrenadante de cultivo y la determinación de las concentraciones de nitrito, nitrato y factor de necrosis tumoral alfa (FNT- α). Cuando se estimuló a los MP con IFN γ (400 U/ml), la concentración relativa de *T.cruzi* en el sobrenadante de cultivo a las 24 hs, para todas las relaciones parásito:célula, fue significativamente menor para el grupo D. Para la relación 1:1, D: 0.24 [0.13-0.40], n=4 (mediana [rango]) y A: 0.54 [0.51-0.56], n=4 (p<0.05). Las concentraciones de nitrito total (nmoles/3.10⁵ células), para las mismas condiciones, fueron D: 46.05 [32.27-49.28], A: 34.28 [31.32-36.12], n=4 (p<0.05). Los niveles de FNT- α no difirieron significativamente entre los grupos. Si bien las parasitemias de las ratas D no descienden a la velocidad verificada en las A (resultados previos), *in vitro* los macrófagos de las primeras pueden eliminar parásitos del sobrenadante con mayor rapidez y producir mayor cantidad de NO, un mediador potencialmente involucrado en su destrucción.

IN152. Contribución de la proteína inflamatoria de macrófagos-1 α (MIP-1 α) al proceso inflamatorio de la infección chagásica aguda en ratón. PETRAY P, CORRAL R, CABEZA MECKERT P*, LAGUENS R*.

Lab.de Virología, Hosp. de Niños R. Gutiérrez, Buenos Aires; *Cát. de Patología II, Fac.de Ciencias Médicas, Univ. Nacional de La Plata, Pcia de Bs. As., Argentina. ppetray@conicet.gov.ar

Con el fin de investigar la contribución de MIP-1 α al proceso inflamatorio que acompaña a la infección aguda por *Trypanosoma cruzi*, 10 ratones Balb/c de 6-8 semanas de edad fueron inyectados ip con 10 μ g/ratón de anticuerpo (Ac) policlonal anti-MIP-1 α 24 h antes de la infección ip con 50 tripomastigotes sanguíneos RA de *T. cruzi*. La administración del Ac se continuó día por medio hasta que los animales fueron sacrificados (15 dpi). Los controles (n=10) recibieron PBS. Se realizaron estudios histopatológicos e inmunohistoquímicos de bazo, corazón y músculo esquelético evaluando el área comprometida por infiltrados inflamatorios. El análisis de secciones histológicas de bazo reveló que el tratamiento con el Ac específico redujo significativamente el reclutamiento de células inflamatorias pero no se halló diferencia entre la extensión de la pulpa blanca y la pulpa roja, determinado por morfometría. En el manto de los folículos linfáticos del grupo tratado se observó además, un menor número de inmunoblastos y células plasmáticas. No se hallaron diferencias entre ambos grupos con respecto a la carga parasitaria tisular. En contraposición, el examen de miocardio mostró una mayor intensidad de la lesión inflamatoria en los animales tratados, principalmente a nivel de ventrículo. El 100% (10/10) de los ratones tratados presentó infiltrados inflamatorios difusos en ventrículo y focales en aurícula, en contraste con el 22% (2/9) del grupo control. Asimismo, se encontró un mayor número de nidos de amastigotes en el grupo tratado. En músculo esquelético no se hallaron diferencias significativas entre ambos grupos en cuanto a la extensión del exudado inflamatorio ni en el parasitismo tisular. Nuestros resultados preliminares sugieren una contribución diferencial (dependiente del órgano blanco) de MIP-1 α a la reacción inflamatoria tisular característica de la infección chagásica.

IN153. Durante la infección con *Trypanosoma cruzi* el fraticidio de linfocitos B mediado por Fas/FasL elimina clones específicos para el parásito. ZUÑIGA E, MOTRAN C, MONTES C, GRUPPI A.

Dpto Bioquímica Clínica. Fac de Cs Químicas. Universidad Nacional de Córdoba. Argentina. agruppi@bioclin.fcq.unc.edu.ar

Previamente demostramos que los linfocitos (Li) B de animales infectados (Inf) con *T. cruzi* sufren *in vitro* de apoptosis espontánea. En el presente trabajo investigamos los mecanismos de muerte involucrados en la apoptosis de LiB durante la fase aguda de la infección con este protozoario. Para estudiar la relación entre apoptosis y activación celular, LiB purificados de bazo de ratones Inf con 500 tripomastigotes en el día 15 postinfección, fueron separados en gradiente de Percoll en: LiB grandes (Bg) y pequeños (Bp). Los LiBg de ratones Inf presentaron mayor grado de activación que los Bp y que los LiB de ratones normales (N), a juzgar por el mayor tamaño celular, expresión de Ags Clase II del MHC y proliferación espontánea. Los LiBg y Bp de los animales Inf presentaron una incrementada apoptosis, medida por tinción con yoduro de propidio, tanto *in vivo* como *in vitro*. El % de apoptosis *in vivo* de los LiB de los ratones Inf fue: Bg 22.7%, Bp 18.4% y de los N fue: Bg 7.2%, Bp 4.3% e *in vitro* (18 h de cultivo) fue: Inf Bg 40.4%, Bp 28.1%; N Bg 3.2%, Bp 2.4%. Los LiBg y Bp de los animales

Inf presentaron mayores niveles de Bcl-2 y Bcl-x_L, determinados por western blot utilizando anticuerpos (Acs) específicos, indicando que la apoptosis observada no está asociada a una baja expresión de estas proteínas. Por FACS observamos que los LiBg de los ratones Inf poseen mayor expresión de Fas y FasL (Inf Bg: Fas 87.5%, FasL 24.1% vs N Bg: Fas 9.4%, FasL 8.5%). El bloqueo de FasL, utilizando Acs específicos, inhibió exclusivamente la apoptosis que sufren los LiBg (42% de inhibición). Por Elispot observamos que luego de 36 h de cultivo los LiB anti-*T. cruzi* mueren (se detectan 1 o 2 LiB por well) y el Ac anti FasL los rescata de la apoptosis (10 a 15 LiB por well) pero no rescata a LiB reactivos con músculo esquelético de ratón (autorreactivos). El estudio de Acs en los sobrenadantes de estos cultivos arrojó datos concordantes. Los resultados indican que los LiB altamente activados controlan su proliferación entre sí via Fas/FasL y ese mecanismo elimina LiB reactivos con el parásito. Así, se retardaría el desarrollo de una respuesta específica y permitiría el establecimiento del parásito en el huésped.

IN154. Expresión diferencial, regulación y función biológica de Galectina-1 de células B activadas durante la infección con *Trypanosoma cruzi*. ZÚÑIGA E*, RABINOVICH G, IGLESIAS M, GRUPPI A*.

*Dpto Bioquímica Clínica. Fac de Cs Químicas. Universidad Nacional de Córdoba. Argentina. agruppi@bioclin.fcq.unc.edu.ar

Se ha demostrado que galectina-1 (Gal-1) posee diversas propiedades inmunomodulatorias. En el presente estudio, investigamos la expresión de Gal-1 en LiB purificados de bazo de ratones infectados con 500 tripomastigotes de *T. cruzi* en el día 15 postinfección o de ratones normales. Observamos mediante western blot y FACS, utilizando un Ac policlonal específico para Gal-1, que esta lectina se expresa en LiB de ratones infectados que presentan un alto grado de activación, localizándose principalmente en el compartimento citosólico. La expresión de Gal-1 fue regulada positivamente por activadores de LiB como LPS, F(ab)₂ anti-μ y anti-CD40, detectándose la máxima expresión frente al entrecruzamiento simultáneo del BCR y CD40. Bajo esta estimulación Gal-1 fue detectada en los sobrenadantes de cultivo. Con el objeto de asegurar su identidad y de utilizarla en estudios funcionales, Gal-1 fue purificada de LiB de ratones infectados por cromatografía de afinidad en una matriz de agarosa-lactosa. Por SDS-PAGE y tinción con plata observamos que la fracción eluida con DEPBS (conteniendo lactosa 100 mM) contenía las formas monoméricas y diméricas de esta lectina, las cuales reaccionaron por Western blot frente al Ac anti-Gal-1. La lectina purificada presentó actividad hemaglutinante la cual fue inhibida por azúcares con configuración β-D-galactosido. Observamos que Gal-1 purificada de LiB no afecta el umbral de muerte de otros LiB (activados o en reposo) sino que induce apoptosis de LiT revelado por FACS por tinción con yoduro de propidio (LiT activados: 7% de apoptosis; LiT activados + Gal-1: 24%). La determinación de citoquinas, por Elisa, en los sobrenadantes de cultivo reveló que Gal-1 inhibe en un 60% la secreción de IFNγ pero no la de IL-2 e IL-10. Estos resultados nos llevan a plantear la hipótesis de que el *T. cruzi* activa a los LiB e induce la expresión de Gal-1 la cual elimina LiT secretores de IFNγ, importantes en el control de la replicación intracelular del parásito.

IN155. El tratamiento sistémico con benznidazol y/o interferón gamma en ratas infectadas con *Trypanosoma cruzi*. Comportamiento de los macrófagos peritoneales ante la infección *in vitro* homóloga. PIAGGIO E, BOTTASSO O, WIETZERBIN J*, REVELLI S.

Instituto de Inmunología, Fac. de Cs. Médicas (UNR) Rosario, Argentina; Unite 365 Instituto Curie de París, Francia. revelli@arnet.com.ar

Dado los efectos inhibitorios *in vitro* del benznidazol (BZL) sobre la producción de citoquinas del macrófago, quisimos investigar si la administración de este compuesto modificaba la funcionalidad de los macrófagos peritoneales (MP) ante la infección *in vitro* con *T. cruzi*. Se utilizaron ratas línea *l* infectadas 7 días antes con *T. cruzi* por vía sc, las cuales recibieron uno de los siguientes protocolos de tratamiento: BZL por vía oral (6 mg/kg día), IFN-(20,000 U/rata/día vía sc, o BZL+IFN-((para determinar la potencial acción del BZL en presencia de una citoquina con acción estimulante sobre el macrófago). Los MP se obtuvieron 7 días después de iniciado el tratamiento y se expusieron a los tripomastigotes en una relación parásito-célula 10:1. El valor de amastigotes/100 células (18 hs después de incubadas, mediana-rango) fue, Control (no infectado ni tratado): 175[135-216], Tc (infección previa sistémica): 163[160-164], Tc+BZL: 26[23-29.8], Tc+IFN-(: 20[18.1-23], Tc+BZL+IFN-([27[25-30] (p<0.02). Nitritos en sobrenadante 18hs (μM, media±es) Control: 45±1.1, Tc: 180±4.3, Tc+BZL: 90±1.4, Tc+IFN-(: 144±5.8, Tc+BZL+IFN-(: 91±4.4 (Control vs resto, p<0.015; Tc vs Tc+IFN-(, p<0.05; Tc+IFN-(vs Tc+BZL y Tc+BZL +IFN-(, p<0.05). Los niveles de FNT-α (pg/ml) fueron, Control: 474±21, Tc: 187±87, Tc+BZL: 682±33, Tc+IFN-(: 383±32, Tc+BZL+IFN-(: 1621±198 (este grupo vs resto, p=0-01; Tc+BZL vs Control, Tc, Tc+IFN-(p<0.04). El tratamiento con BZL, sólo o combinado con IFN-(, hizo que los MP fueran menos permisivos a la multiplicación parasitaria. Ello no estuvo acompañado de una mayor producción de NO sino de TNF-α, lo que sugiere la existencia de un mecanismo antiparasitario independiente del primero. El BZL parece ejercer efectos diferenciales sobre la producción de NO y FNT-α.

IN156 Efecto de IL-1β y TNF-α sobre la producción de óxido nítrico y la multiplicación del *T. cruzi* en cultivos de cardiocitos de rata. ALVAREDA C, POSTAN M, SCHAEERER B, FICHERA L.

Instituto Nacional de Parasitología Dr. M Fatala Chabén, ANLIS Malbrán. Buenos Aires, Argentina. mpostan@mail.retina.ar

El objetivo de este trabajo es determinar la capacidad de respuesta de células musculares cardíacas infectadas con *T. cruzi* *in vitro*, al estímulo con IL-1β y TNF-α. Se infectaron cultivos primarios de cardiocitos obtenidos de ratas Wistar neonatas (5x10⁴ células/pocillo) con el clon de *T. cruzi* Sylvio-X10/4 (5:1 parásitos/célula), a los cuales se les agregó 5, 10 y 15 ng de IL-1-β ó 25, 50 y 100 ng de TNF-α. Se determinó la presencia de nitritos en el sobrenadante de los cultivos, mediante el método de Griess, y se evaluó por MO el porcentaje de células cardíacas conteniendo amastigotes, a las 72 hs post-infección.

Los resultados mostraron que el estímulo con IL-1-β y TNF-α produjo una acumulación progresiva de NO en los sobrenadantes, tanto en los cultivos infectados como en los controles. El análisis de las curvas dosis-respuesta mostró

que el nivel de producción de NO estimulado por TNF- α es dosis-dependiente, fenómeno que no se evidenció con IL-1 β . Sin embargo, las concentraciones de nitritos alcanzadas por los cultivos estimulados con IL-1 β fueron significativamente mayores que con la estimulación por TNF- α . En los cultivos controles no estimulados (infectados y no infectados), la producción de NO se mantuvo a nivel basal. El análisis de los datos del parasitismo intracelular mostró que el número de células conteniendo nidos de amastigotes en los cultivos tratados con las citoquinas es significativamente menor que en los controles infectados no tratados, correlacionándose inversamente con la producción de NO. El agregado de L-NAME a los cultivos junto con cada citoquina, determinó una inhibición de la producción de NO por los cultivos, neutralizando también el efecto inhibitor de las mismas sobre el crecimiento intracelular del *T. cruzi*. Estos resultados demuestran la capacidad inhibitoria de las células musculares cardíacas sobre la multiplicación intracelular del *T. cruzi*, mediada en parte por la producción de NO, cuando son estimuladas por las citoquinas IL-1 β y TNF- α .

Financiación por MSyAS Y FONCyT de Argentina.

IN157. Producción de IL-12p70 en la infección experimental con *Trypanosoma cruzi*. ANTUNEZ MI, CARDONI RL.

Instituto Nacional de Parasitología "Dr. M. F. Chabén"
ANLIS, Buenos Aires, Argentina.
mantunez@mail.retina.ar

La IL-12 participa de manera central en la generación de la respuesta inmune tipo Th1. Su forma biológicamente activa (p70) está formada por dos subunidades, la p40 y la p35. En la infección experimental con *T. cruzi* encontramos un aumento significativo de los niveles séricos de IL-12 p40 a partir de los 2 días pi (post-infección), que se mantuvo aun en la fase crónica. Estudiamos, mediante la técnica de ELISA de captura, la presencia de IL-12 p70 en el suero de ratones BALB/c y C3H infectados con *T. cruzi*, cepa Tulahuén. A los 2 días pi sólo encontramos niveles detectables en la mitad de los ratones C3H y en un 20% de los BALB/c, proporción que no varió en la tercer semana pi. En la etapa crónica sólo 4 de 13 ratones mostraron un incremento de IL-12 p70, a pesar de que en todos ellos la IL-12 p40 se encontró elevada. Con el objeto de evaluar si la forma activa se libera localmente en los órganos linfáticos, estudiamos su producción espontánea por células de bazo. Encontramos un aumento significativo de IL-12 p70 en ambas cepas de ratones sólo a los 2 días pi: BALB/c N: 33 \pm 4, I: 63 \pm 3; C3H N: 21 \pm 2, I: 59 \pm 14. A pesar de que ambas cepas liberaron niveles similares de IL-12 p70, sólo los C3H tienen incrementada la actividad NK y la producción de IFN- γ en los primeros días de la infección, lo que sugiere la presencia de inhibidores y/o la ausencia de señales adicionales necesarias para desencadenar la actividad NK y la liberación de IFN- γ en el bazo de los ratones BALB/c. Los resultados muestran la producción localizada de la forma biológicamente activa de la IL-12, mientras que el exceso de la p40 podría ejercer efectos moduladores sobre la respuesta inmune.

Financiación: CONICET y FONCyT PICT 5-139-2330.

IN158. Interleuquina-4 rescata a los linfocitos B específicos para *Trypanosoma cruzi* de la muerte por apoptosis por aumentar la expresión de Bcl-x $_L$. ACOSTA-RODRIGUEZ E, ZUÑIGA E, MONTES C, GRUPPI A.

Dpto Bioquímica Clínica, Fac de Cs Químicas, UNC, Córdoba, Argentina. agruppi@bioclin.fcq.unc.edu.ar

Durante la fase aguda de la infección experimental con *T. cruzi* se observa una supresión de la respuesta celular y humoral que permite el establecimiento del parásito en el huésped. Previamente demostramos que los linfocitos (Li) B de animales infectados con *T. cruzi* sufren *in vitro* de apoptosis espontánea. Nuestro objetivo general es identificar señales involucradas en el rescate de la muerte de LiB que sufren apoptosis durante la fase aguda de la infección con este protozoario. En el presente trabajo evaluamos el efecto de IL-4. Para ello, LiB purificados de bazo de ratones normales o infectados con 500 tripomastigotes (día 15 postinfección), fueron cultivados durante diferentes tiempos en ausencia o presencia de distintas concentraciones de IL-4. Observamos que IL-4 estimula la proliferación de los LiB, determinada por incorporación de timidina tritiada, tanto de los LiB provenientes de ratones infectados (LiBInf) como de los normales (LiBN). La concentración de IL-4 que indujo los máximos niveles de proliferación, detectados entre las 72 y 96 h de cultivo, fue de 25 ng/well. Por FACS, mediante tinción con yoduro de propidio, observamos que IL-4 fue capaz de rescatar de la apoptosis espontánea tanto a los LiBInf (LiB basal: 65% de apoptosis; LiB+IL-4: 30%) como a los LiBN (LiB basal: 34% de apoptosis; LiB+IL-4: 17%). Mediante ensayos de Elisa observamos que los niveles basales de Acs anti F105 (Ags parasitarios) y anti músculo esquelético de ratón (ME) (Ags autorreactivos) en los sobrenadantes de cultivo de LiBN no se modifican por el agregado de IL-4. Sin embargo en los sobrenadantes de LiBInf, IL-4 incrementó un 70% el nivel de IgM y un 56% el nivel de IgG específicas para F105; y no modificó los niveles de Acs anti ME. Por western blot utilizando Acs anti-Bcl-x observamos que la estimulación con IL-4 no modifica los niveles basales de expresión de Bcl-xL en los LiBN, pero la incrementa significativamente en los LiBInf. Los resultados indican que IL-4 rescata de la apoptosis espontánea a los LiB específicos para *T. cruzi*, al aumentar la expresión de Bcl-xL; permitiendo el desarrollo de una respuesta humoral capaz de controlar la proliferación del parásito.

IN159. Activation of B cells and macrophages by *Trypanosoma cruzi* DNA. BROWN WC, SHODA LKM, BERTOT GM*, CORRAL RS*.

*Dept. of Veterinary Microbiology and Pathology, Washington State University, Pullman WA, USA; *Laboratorio de Virología, Hospital de Niños Ricardo Gutierrez, Buenos Aires, Argentina. ricardocorral@usa.net*

Based on the mitogenicity of bacterial and other non-vertebrate DNAs for murine B cells and macrophages, immunomodulatory properties of DNA from *T. cruzi* were examined. *T. cruzi* DNA proved to be largely non-methylated and induced proliferation of purified B cells from non-exposed animals in a dose-dependent manner, which was reduced by DNase treatment or methylation with CpG methylase. The stimulation by DNA correlated with its GC content, and based on sensitivity to digestion with HpaII, *T. cruzi* DNA was shown to contain unmethylated CG dinucleotides. CG dinucleotide frequency in *T. cruzi* DNA is less than that in *E. coli* (4% vs 6%). Like *E. coli* DNA, parasite DNA stimulated macrophages to express inflammatory cytokines. *T. cruzi* DNA induced transcripts for IL-12 p40, IL-12 p35, iNOS, and TNF-alpha. NO and TNF-alpha were also measured by the Griess assay and by ELISA. These studies identify a potential mechanism by which this protozoal parasite may

activate innate defense mechanisms that could enable host survival and result in persistent parasitic infection. Furthermore, our results indicate the potential use of non-vertebrate DNA and defined CpG oligonucleotides as vaccine adjuvants.

IN160. Inducción de mecanismos protectivos en fasciolosis experimental. CERVI L, CHIAPELLO L, BLOIS S, MASHI DT.

Parasitol. y Micol. Dpto. Bioq. Clin. F.C. Quím. UNC, Córdoba, Argentina. lcervi@bioclin.fcq.unc.edu.ar

El objetivo del trabajo fue evaluar el potencial de los antígenos de un homogenato total de *F. hepatica* (HT) para modular la respuesta Th1-Th2, específica al parásito, y también la capacidad protectora de los mismos en animales inmunizados. Se inyectaron ratas Wistar por vía s.c. con 1.6 mg/ml de HT emulsionado en adyuvante de Freund completo (AFC) en una dosis. Siete días post inm. se midió la proliferación al HT en células de nódulos linfáticos (CNL) por incorporación de timidina tritiada y se determinó los niveles de IFN- γ , IL-10 e IL-4 en los sobrenadantes de cultivo (ELISA de captura). Los animales se inmunizaron en los días 0 y 15 con HT-AFC (grupo problema) y con AFC (grupo control). A los 15 días de la 2da inmunización, ambos grupos se infectaron por vía oral con 30 metacercarias. En el día 60 se determinaron los niveles de infección por el recuento de gusanos en hígado. Además, investigamos la capacidad del oligodeoxinucleótido CpG (ODN) 1826 y no CpG (1982) (a ser probados como adyuvantes) para inducir una respuesta Th1 in vitro. Se estudió la respuesta proliferativa de Cmb normales y producción IFN γ , e IL-4 frente a los 2 ODN. Los resultados demostraron un marcado incremento en la respuesta proliferativa de CNL de animales inmunizados con HT-AFC respecto de los controles (AFC) ($p < 6 \times 10^{-6}$), con un aumento en la producción de IFN γ (inmunizados con HT-AFC vs AFC $p < 0.03$) y disminución en la producción de IL-4 e IL-10 ($p < 0.02$ y $p < 0.02$ respectivamente). La inmunización de los animales con HT-AFC indujo una reducción del 76% en el número de gusanos ($p < 0.03$). La proliferación de Cmb incrementó 55 veces en presencia de CpG ODN 1826, y 25 veces con el 1982 respecto del basal. El agregado a los cultivos de Cmb de CpG ODN 1826 incrementó la producción de IFN γ y disminuyó la producción de IL-4 comparado con los niveles producidos en presencia del ODN 1982 ($p < 0.01$ y $p < 0.001$ respec.). Los resultados demuestran que la inmunización de ratas con el HT de *F. hepatica* indujo un perfil de respuesta Th1 específica al parásito y niveles significativos de protección. Experimentos para probar la capacidad protectora del ODN 1826-HT se encuentran en desarrollo en nuestro laboratorio. El ODN 1826 podría mejorar los niveles de protección obtenidos.

IN161. Análisis del efecto adyuvante de la proteína recombinante Hsp83 de *Leishmania infantum* como herramienta para vacunación. ECHEVERRIA P¹, DRAN G², GUARNERA E¹ y ANGEL S O.¹

¹Instituto Nacional de Parasitología Dr. Mario F. Chaben/ANLIS Dr. Carlos G. Malbrán, Departamento de Parasitología Sanitaria, Buenos Aires, Argentina. ²Academia Nacional de Medicina, Buenos Aires, Argentina. : sangel83@hotmail.com.

Se analizaron las propiedades inmunoestimuladoras de la proteína de choque térmico de *Leishmania infantum* LiHsp83 para activar una respuesta inmune contra un

antígeno reportero ligado físicamente. Ratonos CF1 fueron inmunizados con diferentes proteínas recombinantes purificadas: MBP, MBP unida a LiHsp83 (MBP-LiHsp83) y LiHsp83. Se obtuvieron muestras de suero a los 0, 21, 28, 40, 60, 90, 120 y 150 días posteriores a la inmunización. La proteína de fusión MBP-LiHsp83 produjo una potente respuesta humoral contra MBP mayor de la obtenida en ratones inmunizados con MBP o MBP mezclada con LiHsp83. Dicha respuesta estuvo dominada por la secreción de isotipos anti-MBP de las clases IgG2a e IgG1 (IgG2a:IgG1, 2:1). En el suero de ratones inmunizados con MBP-LiHsp83 o LiHsp-83 no se observó, al analizar por Western blot, reactividad cruzada con proteínas provenientes de fibroblastos de ratón, mostrando ser una respuesta específica. En el caso de los ratones inmunizados con MBP-LiHsp83 la respuesta humoral se mantuvo al menos por el término de 150 días, mientras que en los inmunizados con MBP solamente, la reactividad desapareció al día 90. En células de bazo procedentes de ratones inmunizados con MBP-LiHsp83 se observó una potente proliferación celular y altos niveles de secreción de INF- γ en comparación con los controles y con las células de bazo provenientes de ratones inmunizados con MBP. En todos los grupos de ratones ensayados la IL-4 fue indetectable. Por lo tanto consideramos que la LiHsp-83 es un candidato prometedor para su uso potencial como vehículo de antígenos ligados en sistemas de vacunación libres de adyuvantes convencionales.

IN162. Efecto de la inmunización con ADNs plasmídicos que codifican para un miembro de la familia Tc13 y una proteína ligadora de calcio del *Trypanosoma cruzi*. GARCIA GA, PRAVIA CA, ESTEVA MI y RUIZ AM.

Instituto Nacional de Parasitología "Dr Mario Fatala Chaben". ANLIS/Malbrán. Buenos Aires. Argentina. gaandgarcia@yahoo.com

Las vacunas de ADN constituyen una nueva forma de expresar antígenos «in vivo» para generar una respuesta inmune tanto humoral como celular. El objetivo de este trabajo fue evaluar la respuesta inmune en ratones inducida por la inoculación de dos plásmidos de expresión que contienen las secuencias codificantes para dos proteínas de *T. cruzi*: PHGST #5 (un miembro de la familia Tc13 perteneciente a la superfamilia de antígenos de superficie del tripomastigote) y F-29 (una proteína ligadora de calcio). Ambas secuencias fueron clonadas en el vector pcDNA 3.1(+) y las construcciones obtenidas fueron utilizadas para transfectar células Cos-7. Dichas células fueron analizadas por inmunofluorescencia con sueros específicos para confirmar la expresión «in vitro». Con los plásmidos recombinantes se inocularon ratones hembras de seis semanas de edad (cuatro dosis de 50 mg de plásmido/dosis/ratón por vía intramuscular cada quince días), recolectándose muestras de sangre doce días después de cada inoculación. Se observó un aumento de la IgG específica evaluada por ensayo de inmunodifusión contra PHGST #5 recombinante a partir de la primera inmunización con pcDNA PHGST #5 mientras que no se obtuvo una respuesta humoral contra F29 en los ratones inmunizados con pcDNA F29 después de tres dosis. Estos resultados preliminares alientan el estudio de la respuesta celular e inmunoprotectora en ratones inmunizados con pcDNA PHGST # 5 dados los buenos antecedentes existentes con otros miembros de la misma superfamilia evaluados por otros autores. La falta de

respuesta humoral obtenida con pcDNA F29, a diferencia de lo que ocurre con la proteína recombinante, hace necesaria una posterior evaluación de la vía de inoculación y el uso de adyuvantes en la producción de una respuesta inmune adecuada.

Este proyecto recibió apoyo de ANLIS/Malbrán y CONICET.

IN163. Vacuna EG95: Inmunidad calostroal y respuesta anticuerpo en corderos vacunados. JENSEN O, FERNANDEZ E, VERON E, MURGO R.

Programa de Control de la Hidatidosis, Chacra 18, Sarmiento, Chubut. Argentina. hidatidosis@coopsar.com.ar.

La aplicación en ovinos de la vacuna recombinante EG95 evita el desarrollo de quistes hidatídicos luego del desafío con huevos de *Echinococcus granulosus*, con un rango de protección de 82 -100%. Como en el suero, en el calostro de las ovejas vacunadas, se detecta actividad anticuerpo específica anti-EG95. Se evaluó la respuesta anticuerpo en el suero de los corderos vacunados, nacidos de ovejas vacunadas y no vacunadas. Se utilizaron muestras de sangre y calostro de tres ovejas vacunadas y sangre de dos de sus corderos; y muestras de sangre de tres corderos vacunados, hijos de madres no vacunados. El análisis de la respuesta fue realizada usando un ensayo k-ELISA y un ensayo inmunoblot. En el k-ELISA la proteína EG95 fue adsorbida a una fase sólida de poliestireno irradiada y la actividad anticuerpo fue determinada usando anti-IgG ovina marcada con fosfatasa alcalina y pNPP en buffer DEA pH 9.8 como sustrato. La actividad enzimática (velocidad de la reacción) fue actividad anticuerpo dependiente. La reactividad anti-EG95 de los sueros y calostros en los inmunoblot fue revelada usando el mismo conjugado y el sistema BCIP / NBT como sustrato. Las respuestas representadas por las magnitudes y el orden relativo de las mismas luego de la primera y segunda dosis obtenidas mediante el ensayo k-ELISA tanto en corderos expuestos como en los no expuestos a actividad anticuerpo anti-EG95 calostroal mostraron similitud. El análisis de la proteína EG95 por inmunoblot probada con el suero de los corderos vacunados y el calostro de las ovejas vacunadas revela una banda con un peso molecular coincidente con el de la proteína en estudio. La inmunidad calostroal no interfirió con la respuesta de anticuerpo en los corderos vacunados.

IN164. Oral ingestion of plant trypanosomatids induced an immune response against *Trypanosoma cruzi* in two strains of mice. MENOLLI RA*, LIZOTTI EM*, PERON JPS**, MOURA TR DE**, GRAÇA VK*, ITOW JANKEVICIUS S*, PINGE FILHO P**, JANKEVICIUS JV*.

**Laboratório de Fisiologia Microbiana e Protozoologia, Departamento de Microbiologia; **Laboratório de Imunologia III - Departamento de Ciências Patológicas; Centro de Ciências Biológicas Universidade Estadual de Londrina Caixa Postal 6001 CEPE 86051-970 Londrina-Paraná-Brasil. jankevic@sercomtel.com.br.*

The Trypanosomatid family is a group of protozoan parasites causing infections in plants and animals, originating important human diseases as Trypanosomiasis and Leishmaniasis. There are immunological cross-reactivity between plant species (*Phytomonas serpens* strain 15T) and human parasites (*Trypanosoma cruzi* strain CL) (Breganó, 1994). An immune response induced intraperitoneally by *P.*

serpens partially protects mice against lethal challenge with *T. cruzi*. We are evaluating the more natural oral immunization by plant trypanosomatids in the course of *T. cruzi* infection. The experimental protocol used culture forms of *P. serpens* strain 15T isolated from tomatoes, obtained in GYPMI liquid medium, as immunogen. The parasites in exponential growth in the liquid medium was used instead water, to feed groups of Swiss and C57BL/6 male adult mice, with an average of 10^8 parasites/animal, once a week, during four weeks. A control group received only culture medium. After immunization, both groups was challenged with an intraperitoneal inoculum of 10^5 Y strain *Trypanosoma cruzi* blood forms. After 5 days, the parasitemia was followed daily until mice dead. A significant reduction of parasitaemia was observed in the immunized groups in comparison with the controls. A little elongation of life span was observed in Swiss mice immunized (60% died in 14th day and the others in the 15th (20%) and 16th) compared with the control (80% died in 13th and the last in the 14th) but all died. The C57BL/6 immunized mice presented 40% of mortality only at day 20 post infection, when parasitaemia levels were high. All the surviving C57BL/6 mice developed reduced parasitaemias, after the 20th day post infection. Further investigations are required to explain the variations in the resistance of Swiss and C57BL/6 mice orally immunized with plant trypanosomatids and infected with *T. cruzi* and are in course. Supported by CNPq/CPG-UEL.

IN165. Antibody response in humans naturally primed to a *Plasmodium falciparum* against vaccine candidate antigens in a Brazilian endemic area. LR PRATT-RICCIO¹; RR GONÇALVES¹; ECE MENDES¹; D CAMUS²; MARRUDA³; M THEISEN⁴; S JAMES⁵; F SANTOS⁶; MF FERREIRA-DA-CRUZ¹; J OLIVEIRA-FERREIRA¹; CT DANIEL-RIBEIRO¹ & DM BANIC¹.

¹Department of Immunology, IOC, RJ, Brazil; ²INSERM U42, Lille, France; ³Aggeu Magalhães Institute, RE, Brazil; ⁴Statens Seruminstitut, Copenhagen, Denmark; ⁵Tulane University Medical Center, New Orleans; ⁶FNS, Porto Velho, Brazil. riccio@gene.dbbm.fiocruz.br, banic@gene.dbbm.fiocruz.br

In the present work we evaluated the humoral immune response in autochthonous and migrant individuals living in a Brazilian endemic area (Porto Velho, Rondonia) against malaria vaccine candidate molecules. For this purpose, antibody frequencies against GLURP-R0/R2, LSA-1, NANP-MAP, Nt47, SPf70, EBA and MSP3 were analyzed in individuals with different degree of exposure to malaria infection: Group-I: autochthonous frequently exposed (RB, n=101); Group-II: migrants frequently exposed (CL, n=86) and; Group-III: individuals rarely exposed, living in an urban area (PV=120). We observed that the group RB showed a frequency significantly higher of responders ($p < 0.05$) for the great majority of the antigens tested (7/8) regardless immunoglobulin types (IgG or IgM) and IgG isotypes: EBA, LSA-1, NANP, Nt47, GLURP R0, GLURP R2 and MSP3. It is worthy to point out that this group showed also parasitemia levels significantly lower than the group CL ($p < 0.05$). Isotype profile analysis of IgG antibodies against Nt47 revealed that the serum of these individuals with higher levels of cytophilic antibodies presented lower levels of parasitemia ($p < 0.05$). These data suggest that the antibodies directed to the antigens assayed in this study may contribute in the process of acquisition of anti-*P. falciparum* immunity.

BBM: BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

BBM166. Babesia bovis: Un nuevo antígeno de superficie potencialmente útil para diagnóstico y vacunación. WILKOWSKY S¹, FARBER M¹, ECHAIDE I², TORIONI DE ECHAIDE S², SUAREZ CE³, PALMER G⁴, HINES S⁴, MCELWAIN T⁴, FLORIN-CHRISTENSEN M^{4,1}

¹CNIA, INTA-Castelar, Argentina, ²INTA, EEA-Rafaela, Argentina, ³ADRU-USDA, Pullman, WA, ⁴Department of Veterinary Microbiology and Pathology, Washington State University, Pullman, USA. mfc@vetmed.wsu.edu.

La babesiosis bovina causada por *Babesia bovis* y por *B. bigemina* es un factor limitante para el desarrollo de la ganadería argentina. Estudios preliminares demostraron que *B. bovis* contiene por lo menos tres genes divergentes que codifican a la familia de antígenos de superficie "Major Surface Antigen-2" (MSA-2) denominados tentativamente msa-2a, b y c. En contraste con los otros dos miembros de la familia, el gen c esta altamente conservado en cepas disjuntas geográficamente. Nuestro objetivo fue determinar si la proteína MSA-2c es expresada por *B. bovis* y si es específicamente reconocida por anticuerpos presentes en sueros de bovinos infectados. Para ello, el marco de lectura abierta completo de msa-2c de la cepa argentina fue clonado en el vector de expresión procariontico pBAD/thioTOPO y la proteína recombinante fue purificada por cromatografía de afinidad. La misma fue evaluada en ensayos de western blotting enfrentándola a una batería de sueros, usando simultáneamente las formas recombinantes de los antígenos RAP-1 de *B. bovis* y MSP-5 de *Anaplasma marginale* como controles positivo y negativo, respectivamente. La totalidad de los sueros de animales infectados con *B. bovis* o conjuntamente con *B. bovis* y *B. bigemina* (n=19) reaccionaron específicamente con el antígeno recombinante MSA-2c. Por otra parte, los sueros de bovinos no infectados (n=5), infectados sólo con *B. bigemina* (n=8) o con *A. marginale* (n=5) no reaccionaron con MSA-2c. Estos resultados constituirían una evidencia indirecta de la expresión de MSA-2c por parte del parásito, tanto como de la capacidad de dicha proteína de inducir una respuesta inmune humoral específica en los bovinos infectados analizados. Estos datos indicarían la potencialidad de MSA-2c para ser usada como herramienta para el diagnóstico diferencial y como candidata para el desarrollo de nuevas vacunas de subunidades.

BBM167. Interrelación entre los procesos de variación antigénica y de enquistamiento en el protozooario intestinal Giardia lamblia. CARRANZA P, FELTES G, ARIENTI H, ECHENIQUE CG, LUJÁN, HD.

Cátedra de Química Biológica, Facultad de Ciencias Médicas. Universidad Nacional de Córdoba. Argentina. hlujan@biomed.uncor.edu

Giardia lamblia, un protozooario parásito de humanos y otros vertebrados, es una importante causa de enfermedad intestinal. *Giardia* utiliza dos bien diferenciados mecanismos de defensa a las condiciones ambientales que enfrenta durante su ciclo vital, tanto fuera como dentro del intestino del huésped. Estos procesos son conocidos como "enquistamiento" y "variación antigénica". Ambos mecanismos se conocen desde hace tiempo, pero las bases moleculares de los mismos no se comprenden con precisión. Con el objeto de lograr un mayor entendimiento de estos procesos y de

verificar si existe una correlación entre ambos, se identificaron y caracterizaron moléculas cuya expresión se induce durante la diferenciación del trofozoito a quiste. Estos estudios condujeron a la identificación, mediante el uso del anticuerpo monoclonal 9B10, de una proteína variable de superficie (VSP/9B10) que posee las características típicas de aquellas que manifiestan variación antigénica en este parásito (región N-terminal rica en cisteínas distribuidas en la secuencia -CXXC-; un único dominio transmembrana y un dominio de cinco aminoácidos en la región C-terminal citosólica que es común a todas las VSP conocidas). Esta VSP fue caracterizada a nivel molecular, genético y biológico. Entre otras particularidades, esta proteína se puede encontrar en trofozoitos provenientes de diferentes grupos de *Giardia* que se creía no compartían estos antígenos de superficie y expresarse al mismo tiempo que otras VSP en la superficie en un mismo trofozoito, hecho nunca antes demostrado para estas proteínas. Además, la aparición de la VSP/9B10 es promovida por el enquistamiento ya sea *in vivo* como *in vitro*. Las VSP se creen que ayudan al parásito a evadir la respuesta inmunológica del huésped, por tal motivo la presencia de esta nueva VSP en parásitos derivados de distintos aislamientos pertenecientes a diferentes grupos y su inducción durante el enquistamiento hacen de la misma un excelente candidato para la formulación de vacunas contra este importante organismo patógeno.

BBM168. Caracterización genética de clones de Trypanosoma cruzi responsables de infección congénita. DIEZ CN, MARCIPAR AJ, MANATTINI S, ZANUTTINI JC, FLORES M, BASTRENTA B.

INTEBIO, Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, Universidad Nacional del Litoral, Santa Fe, Argentina; Hospital Regional Reconquista, Argentina; IBBA, La Paz, Bolivia. cdiez@fbc.unl.edu.ar.

El diagnóstico serológico de la infección congénita por *Trypanosoma cruzi* presenta dificultades debido a la transferencia pasiva de los anticuerpos IgG de la madre. Además la parasitemia no es siempre evidenciable por los métodos parasitológicos convencionales.

Nuestro grupo de investigación viene trabajando en la detección de la infección por *T. cruzi* en neonatos, por la reacción de la polimerasa en cadena (PCR). En este trabajo se realizó la determinación de infección por PCR utilizando como métodos de referencia micro Strout y serología hasta los 8 meses de vida. A esta técnica se incorporó la caracterización genética del parásito mediante la hibridación de las regiones variables de los minicírculos del ADN del cinetoplasto (HVRm) con sondas que reconocen secuencias específicas para los subgrupos filogenéticamente distintos que se correlacionan con la presencia de zimodemas previamente estudiados. Fueron utilizadas las sondas 20 y 39, que reconocen dos grupos mayores de clones caracterizados por importantes distancias evolutivas entre ellos y que se encuentran ampliamente distribuidos y frecuentemente asociados en un mismo insecto.

Los amplificadores a partir de los neonatos infectados fueron reconocidos exclusivamente por la sonda 39 y en ningún caso por la sonda 20. Estos resultados hacen plausibles las hipótesis de una selección de clones por parte de la madre o de una mayor infectividad y riesgo de infección transplacentaria por *T. cruzi* correspondiente a la sonda 39.

BBM169. Clonado y caracterización parcial de una proteína de la familia de las hsp70 de *Trypanosoma cruzi*. CABEZA ML, DEKANTY A, MARCIPAR IS, MARCIPAR AJ, SILBER AM.

INTEBIO, Facultad de Bioqca. y Cs. Biológicas (UNL) Santa Fe, Argentina. lcabeza@arnet.com.ar

En nuestro laboratorio se han encarado trabajos orientados a la obtención de antígenos recombinantes relevantes para el diagnóstico serológico. Para esto se llevó a cabo una estrategia de inmunorastreo sobre una biblioteca de expresión de ADNc de tripomastigotes de la cepa CL Brener utilizándose como sonda de detección un pool de sueros de 140 pacientes que cursaban una infección crónica asintomática. La caracterización de este pool de sueros demostró para el mismo un título de 12800 en ensayos de ELISA y el reconocimiento de un patrón complejo de bandas en un ensayo de western blot con y sin tratamiento deglicosilante, no habiéndose observado diferencias en la reactividad. Luego del inmunorastreo se obtuvo un clon codificante para una proteína altamente reactiva con los anticuerpos utilizados. A partir de la inducción de la expresión en el fago se obtuvieron anticuerpos purificados por inmunofinidación contra la proteína recombinante. Estos mostraron por ensayos de western blot sobre tripomastigotes y epimastigotes el reconocimiento de un antígeno de 75 kDa. Por otra parte, se amplificó el inserto de ADNc mostrando un tamaño de aproximadamente 1.8-2 Kb. Este inserto fue subclonado y secuenciado parcialmente, encontrándose una homología significativa (91-95% para los fragmentos comparados) con la proteína del retículo endoplásmico regulada por glucosa de 78 kDa del *T. cruzi*, miembro de la familia de proteínas de shock térmico de 70 kDa. Ensayos preliminares de evaluación de la capacidad diagnóstica de esta proteína realizados en nuestro laboratorio indican que este antígeno podría ser relevante para el diagnóstico de la infección en pacientes indeterminados o crónicos. En este momento se está procediendo a la optimización de un sistema de expresión en un vector plasmídico a efectos de realizar una evaluación definitiva de la capacidad antigénica de esta proteína sobre un panel de sueros de pacientes que cursan una infección asintomática.

BBM170. Cambios estructurales en *Trypanosoma cruzi*: incorporación de gangliósidos. COSSY ISASI S., RODRÍGUEZ M., *FRETES R. Y BRONIA D.

Cátedra de Química Biológica y *Cátedra de Histología, Facultad de Ciencias Médicas, UNC.

Los gangliósidos son moduladores de fenómenos biológicos de células de organismos eucariotas pluricelulares cuyas membranas integran. También fueron descriptos en la membrana plasmática de parásitos unicelulares como *Entamoeba histolytica* y *Trypanosoma cruzi*. En este trabajo exploramos los cambios observados en formas no invasivas (epimastigotes) de *T. cruzi* al incorporar gangliósidos. Para la incorporación de gangliósidos los parásitos fueron cultivados en medio BHI 10 % SFB y a 4, 7 y 14 días fueron cosechados y luego de lavar con PBS 0,9 % p/v Na Cl fueron incubados en medio Dulbecco sin suero por 18 horas con o sin agregado de 300 μ M de gangliósidos totales de cerebro bovino. Se observó incremento moderado pero significativo de microviscosidad del plasmalema de los parásitos, revelado por anisotropía de difenilhexatrieno (DPH), como reacción inmediata y luego de 18 horas en presencia de gangliósidos. Las actividades de enzimas

glutamato deshidrogenasa (GDH-NADP) y malato deshidrogenasa MDH-NAD) medidas en extractos crudos luego de 18 horas de tratamiento en parásitos de 4; 7 y 14 días presentaron incremento (GDH) y disminución (MDH) respectivamente. Se verificó la formación de grupos carbonilo en proteínas encontrándose que disminuía en un 40 % en los parásitos tratados. Determinaciones preliminares de calcio intracelular empleando la sonda Fura2 AM revelaron una disminución del índice en los parásitos tratados respecto a los controles. El examen al microscopio electrónico evidenció ausencia de alteraciones estructurales en los parásitos control. Contrariamente, en los parásitos tratados se observaron múltiples alteraciones: citoplasma más claro y presencia de vacuolas electro-lúcidas sobre la región anterior de la célula opuesta al citostoma, cuerpos multilamelares, dilatación de las crestas mitocondriales, desorganización del kDNA, separación entre el kinetoplasto y la membrana mitocondrial así como pérdida de heterocromatina. Considerando la regulación diferencial de las actividades enzimáticas estudiadas, los resultados sugieren que la incorporación de gangliósidos en *T. cruzi* produce un cambio metabólico en que disminuye la glucólisis y aumenta la actividad y la eficiencia oxidativa. Esta regulación va asociada con alteraciones ultraestructurales y podría ser mediada por fluctuaciones en el calcio intracelular.

BBM171. Ultrastructural study of reservosomes and transferrin uptake during the differentiation of *Trypanosoma cruzi*. FIGUEIREDO, R.C.B.Q.¹, ROSA, D.S.¹, GOMES Y.M.², NAKAZAWA, M.² & SOARES M.J.³

¹Departamento de Patologia e Biologia Celular, CPqAM/FIOCRUZ, ²Departamento de Imunologia, CPqAM/FIOCRUZ, - ³Departamento de Ultra-estrutura e Biologia Celular, IOC/FIOCRUZ. bressan@cpqam.fiocruz.br.

Epimastigote forms of *T. cruzi* present large membrane-bound organelles at their posterior end named reservosomes. These organelles are absent in amastigote and trypomastigote forms. Previous studies have shown that proteins ingested by the epimastigotes are accumulated in the reservosomes. In this study, we transferred bloodstream trypomastigotes to LIT medium supplemented with gold-labelled transferrin (Tf-Au) in order to analyse, at the ultrastructural level, the occurrence of reservosomes and endocytosis during the differentiation of trypomastigotes into epimastigote. Within 48 hours of cultivation bloodstream trypomastigotes differentiated into amastigotes which adhered to each other forming large clusters. After 72 hours, small reservosomes were detected close to the Golgi, in cells with intermediary characteristics between ama- and epimastigotes. Tf-Au labelling could be found only at the surface of these ama- and epimastigotes, while labelling in the reservosomes was observed only in typical epimastigotes. These results suggest that reservosomes are not formed by maturation of endocytic vesicles, but rather arise from the fusion of Golgi-derived vesicles. Only in a later stage of the epimastigote cell cycle, endocytic vesicles bud off from the flagellar pocket and the cytostome and fuse with reservosomes. The absence of endocytic activity in both trypo- and amastigote forms suggest that other mechanisms are implicated in the iron acquisition by these evolutive stages of *T. cruzi*. These data together suggest that the endocytic activity is strongly related to reservosomes biogenesis in epimastigote forms.

Supported by CPqAM, FIOCRUZ & FACEPE.

BBM172. The study of mixed cultures and biochemical characterization of *Trypanosoma cruzi* using lectins. ARAÚJO CAC*, MELLO CB†, FERNANDES O• AND JANSEN, AM*

*Departamento de Protozoología, Instituto Oswaldo Cruz- FIOCRUZ; †Departamento de Bioquímica e Biología Molecular, Instituto Oswaldo Cruz-FIOCRUZ; •Departamento de Medicina Tropical, Instituto Oswaldo Cruz- FIOCRUZ. cacaraujo@hotmail.com.

The genetic diversity of *Trypanosoma cruzi* is one of its most puzzling characteristic. This parasite exists in nature as a complex heterogenous population and is an excellent model to study intraespecific interactions, since it is a specie with a high variability. Several studies have been done to understand the parasite heterogeneity like eletrophoretic mobility of isoenzymes, which have been exploited as a method to characterize *T. cruzi* strains. Based on molecular biology using the mini-exons, two phylogenetic distinct groups emerged: *T. cruzi* II associated with domiciliar cycle and *T. cruzi* I associated with sylvatic cycle, following Miles (1977) zymodemes 2 and 1. The distance among these two groups is very significative and some authors suggest that they could be subspecies or even distinct species. In an attempt to find a biochemical marker, we are using lectins as a method to characterize the two main *T. cruzi* subpopulations in a mixed LIT medium culture. We are using Y strain and Dm28c clone. Our preliminary results show that the mixed culture of the parasites display a lower doubling time (18hr) when compared to the controls of Y (36hr) and Dm28c (26hr) alone. The parasites were submitted to Flow Cytometric Analysis (FACS) using *Arachis hypogaea* (PNA)-FITC lectin and we observed that the percentage of labeled cells was higher for Dm28c clone (84-88%), while Y isolate was 6,6-7,5%. These data suggests that in the surface of Dm28c parasites exists galactose-N-acetyl galactosamine residues. Epimastigotes and metacyclic trypomastigotes in the culture were labeled too. In the mixed culture the percentage of parasites labeled was 73,6-76,9%, we could see that Dm28c clone were in a higher rate than Y isolate, and it seems that Y strain stimulates Dm28c growth. Our experiments will continue trying to clarify the mixed behaviour.

BBM173. Plasmodium vivax emplaza un sistema de tráfico intracelular en el eritrocito infectado. BRACHO C, DUNIA I*, BENEDETTI EL*, PEREZ HA.

Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas, Caracas, Venezuela; *Institut J Monod, CNRS-Université de Paris, Francia. cbracho@pasteur.ivic.ve.

Los estadios eritrocíticos de los parásitos *Plasmodium* crecen y se dividen activamente en el interior de una célula menos activa en procesos de biosíntesis y pobre en organelas para el tráfico intracelular de proteínas. Hemos estudiado el tráfico secretor de una proteína de *Plasmodium vivax* (Pv-148) que es sintetizada por el parásito durante su desarrollo eritrocítico. Estudios de la ultraestructura del glóbulo rojo parasitado (GRP) demostraron que a tiempo que transcurre la esquizogonia, surgen en el citoplasma del GRP una serie de estructuras membranosas, como caveolas, vesículas y cisternas. Éstas, en el GRP con trofozoitos maduros, logran conformar una red de membranas tubovesiculares (MTV). Mediante inmuno-microscopía electrónica y un anticuerpo monoclonal (AcM 7C5B71) a Pv-148, encontramos que éste es transferido al citoplas-

ma y membrana de superficie del GRP en asociación con la red MTV. En las cisternas del GRP coinciden Pv-148 y un antígeno que reaccionó con un AcM específico para una ATPasa-Ca⁺⁺ del retículo-endoplásmico. Las estructuras de tráfico asociadas con el transporte de Pv-148 pudieron teñirse con Bodipy®-ceramida, un derivado fluorescente de la ceramida que tiñe selectivamente el aparato de Golgi. Se discuten las implicaciones de estos hallazgos en la organización de diferentes rutas secreción/excreción utilizadas por el parásito para interactuar con el ambiente intra y extracelular.

BBM174. Trichomonas vaginalis: citoesqueleto y endocitosis. COSTAMAGNA SR y PRADO FIGUEROA M.

Departamento de Biología, Bioquímica y Farmacia. Universidad Nacional del Sur. San Juan 670 (8000) BAHIA BLANCA. rcostama@criba.edu.ar.

El presente estudio está referido a la ultraestructura de *Trichomonas vaginalis*, cultivadas en medio líquido. Su citoesqueleto, fenómenos de endocitosis y la morfología de sus hidrogenosomas fueron observados por microscopía electrónica de barrido y de transmisión. Las técnicas clásicas para el procesamiento al SEM y TEM de este flagelado fueron discreta y sutilmente modificadas por nosotros. Las micrografías obtenidas se mostrarán. Sobre la base de nuestros resultados podemos concluir que: 1. Las técnicas modificadas empleadas son adecuadas para el estudio morfológico y ultraestructural de este Protozoo. 2. Al TEM su citoplasma no muestra mitocondrias. 3. Utiliza los fenómenos de micropinocitosis asociados con vesículas con cubierta como mecanismo habitual de endo y exocitosis selectiva, mientras que para partículas mayores la fagocitosis es frecuentemente vista. 4. Con referencia al citoesqueleto, los microtúbulos que recorren el parásito son numerosos, conformando estructuras diversas, las cuales son analizadas en este trabajo. 5. Posee numerosos hidrogenosomas alineados debajo de la membrana ondulante y a lo largo del axostylo, mostrando importantes depósitos electrón-denso a modo de "opérculo" en cada uno.

BBM175. Resistencia del tripanosomátido Phytomonas T274 a la droga DFMO. CEJAS S, CARRILLO C, CORTES M, GONZALEZ NS, ALGRANATI ID.

IIB-Fundación Campomar. (FECyN-UBA). Buenos Aires, Argentina. scejas@iib.uba.ar.

Las poliaminas son compuestos orgánicos esenciales para el crecimiento y proliferación celular. La enzima ornitina decarboxilasa (ODC) que cataliza el primer paso en la biosíntesis de estos compuestos, es inhibida irreversiblemente por el análogo de ornitina, α -difluorometilornitina (DFMO). Esta droga es capaz de inhibir la proliferación de parásitos tripanosomátidos digenéticos tales como *Leishmania mexicana* y *Trypanosoma brucei*. Dentro de los parásitos digenéticos pertenecientes a la familia de los tripanosomátidos se encuentra el género *Phytomonas*, cuyo vector es un insecto y el hospedador una planta. En este trabajo se estudió el efecto de la droga DFMO sobre la proliferación de *Phytomonas* T274.

El agregado de la droga a parásitos en cultivo no inhibió su proliferación aún a altas concentraciones (50mM). Con el objetivo de estudiar las causas de la resistencia de *Phytomonas* al DFMO, se estudió la permeabilidad del parásito y la sensibilidad de la enzima a la droga. Se observó

que el compuesto es capaz de penetrar en las células e inhibir efectivamente a la enzima ODC. En base a estudios moleculares se demostró que la resistencia a la droga tampoco se debe a la amplificación del gen de la ODC.

Aprovechando la capacidad del DFMO de bloquear a la ODC, se estudió la posible existencia de una vía alternativa para la producción de poliaminas mediada por la enzima arginina descarboxilasa (ADC). Tanto ensayos *in vitro* como *in vivo* demostraron la ausencia de esta vía. Se cuantificaron por HPLC las poliaminas endógenas, tanto en cultivos controles como en aquéllos en los que se agregó DFMO, encontrándose que las poliaminas putrescina y espermidina disminuyen en presencia de la droga. Sin embargo la disminución de putrescina resultó ser mucho más marcada que la de espermidina.

La ODC de *Phytomonas* mostró ser una enzima metabólicamente inestable (vida media ~20min). Esta tasa de recambio tan alta permite suponer que siempre existiría una fracción activa de la enzima que permitiría la síntesis de poliaminas necesarias para la supervivencia y proliferación celular.

BBM176. Protección de la muerte apoptótica en *Trypanosoma cruzi* mediada por L-arginina: contribución del óxido nítrico y de la síntesis de poliaminas. PIACENZA L, PELUFFO G, DENICOLA A, RADI R.

Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad de la República, Montevideo-Uruguay. lpianenza@lobbm.fmed.edu.uy.

La muerte celular programada así como la producción de óxido nítrico se creían procesos exclusivos de células de mamíferos. La existencia de éstos procesos en parásitos unicelulares ha sido recientemente descrita. En éste trabajo nos abocamos al estudio de la interrelación existente entre la producción de NO y la muerte apoptótica inducida en epimastigotas de *Trypanosoma cruzi* por 10% de suero humano. La muerte apoptótica se evaluó mediante estudios de proliferación en presencia de [³H]-timidina y visualización de la fragmentación del ADN en geles de agarosa. La suplementación con L-arginina (10mM), protege a los epimastigotas de la muerte apoptótica como se observa por la recuperación del índice de proliferación y la ausencia de fragmentación del ADN. La presencia del inhibidor de la NOS, N^w-nitro-arginina-metil-éster (NAME), revierte ambos efectos. Diferentes dadores de NO [NOC-18 (1-hidroxi-2-oxo-3,3-bis (2-aminoetil)-1-triazeno) y DETA-NONOato] fueron utilizados para reproducir los efectos protectores observados con la L-arginina. Flujos de 0.2-0.25 NO $\mu\text{M min}^{-1}$ (equivalentes a la producción de estimada para el parásito) protegen la fragmentación del ADN pero no recuperan los índices de proliferación, lo que indica que la L-arginina recupera la incorporación de [³H]-timidina a través de un mecanismo independiente al NO. En efecto, la L-arginina puede actuar como precursor en la síntesis de poliaminas (policaciones indispensables en los procesos de proliferación) a través de la arginina descarboxilasa (ADC) y producción de agmatina. Nuestros resultados muestran que la suplementación con putrescina, agmatina y espermina protegen de la muerte tanto a nivel de la proliferación celular como de la fragmentación del ADN. En presencia de L-arginina, los índices de proliferación son inhibidos por el inhibidor específico de la ADC (di-fluoro-metil-arginina), mientras que la protección sobre la fragmentación del ADN persiste. En conjunto, nuestros resultados sugieren que la protección de la muerte celular

programada mediada por L-arginina está dada por: i) producción endógena de NO responsable de la inhibición de la fragmentación del ADN observada en la fase de ejecución del programa de muerte apoptótica y ii) actuando como precursor de la síntesis de poliaminas a través de la ADC lo que sustenta la proliferación celular.

BBM177. Alfa 2-macroglobulina y Pregnancy Zone Protein inhiben la actividad de cruzipaína y acomplejan isoformas de membrana de cisteíno proteinasas inmunológicamente relacionadas. RAMOS A, DUSCHAK V*, VIDES MA, CHIABRANDO G.

Dpto de Bioq. Clínica, Fac. Cs. Químicas (UNC), Córdoba, Argentina. *IIB (UNSAM), Bs As, Argentina. amramos@bioclin.fcq.unc.edu.ar.

Previamente demostramos por métodos electroforéticos que los inhibidores humanos de proteinasas Alfa 2-macroglobulina ($\alpha 2$ -M) y Pregnancy Zone Protein (PZP) interaccionan con cruzipaína, la principal cisteíno proteinasa del *T. cruzi*. Para confirmar el acomplejamiento de la enzima con ambas α -Macroglobulinas (α -Ms) y determinar el posible efecto inhibitorio de la actividad enzimática, se realizaron diversos ensayos inmunoquímicos y enzimáticos. Además, se estudió también la interacción de $\alpha 2$ -M y PZP con una posible isoforma de membrana de cruzipaína.

Ensayos de western blot mostraron que cruzipaína fue inmunodetectada en forma libre y también asociada a bandas de alto PM (>360 kDa) coincidentes con dímeros de $\alpha 2$ -M y PZP, indicando la formación de complejos covalentes enzima-inhibidor. La presencia de la enzima activa incorporada al complejo fue también observada a través de su actividad lítica sobre gelatina copolimerizada en geles de poliácridamida. Además, la actividad de cruzipaína medida con el sustrato de bajo PM Bz-Pro-Phe-Arg-pNA fue inhibida con ambas α -Ms de modo significativo a los 5 min. Este efecto inhibitorio fue dependiente de la cantidad de α -Ms, siendo ya observado a partir de relaciones molares enzima/inhibidor de 1:0.25. Además, $\alpha 2$ -M y PZP también fueron capaces de formar complejos covalentes con isoformas de cisteíno proteinasas inmunológicamente relacionadas con cruzipaína, presentes en un pool de proteínas hidrofóbicas extraídas con Triton X-114, y con preparaciones de estas isoformas purificadas por afinidad en columnas de ConA-Sepharose. El presente estudio sugiere que el acomplejamiento "in vivo" de $\alpha 2$ -M y PZP con cruzipaína podría prevenir o minimizar la acción proteolítica de la misma sobre moléculas del huésped, regulando hipotéticamente funciones parasitarias dependientes de esta enzima.

BBM178. Modificaciones selectivas en las concentraciones de aminoácidos y cambios en la actividad de proteinasas en *Trypanosoma cruzi*. REMEDI MS, CIVALLERO G*, DODELSON DE KREMER R*, GEREZ DE BURGOS N.

*Cátedra de Química Biológica y *CEMECO. Facultad de Ciencias Médicas. Universidad Nacional de Córdoba. Córdoba, Argentina. sremedi@biomed.uncor.edu.*

La proteólisis de proteínas endógenas desempeña un rol importante en la adaptación del *T. cruzi* a las diferentes condiciones a que es expuesto durante su ciclo de vida. En trabajos previos analizamos actividad de enzimas involucradas en el metabolismo de aminoácidos en *T. cruzi* de diferentes edades de cultivo (4, 7, 14 días) y en aquellos epimastigotes que indujeron la fusión de glóbulos rojos (GR).

Una disminución en la actividad de alanina aminotransferasa (AIAT) y un aumento en la actividad de glutamato deshidrogenasa (GDH) fue observado durante el envejecimiento de los parásitos en el cultivo. En epimastigotes que indujeron la fusión de GR, en cambio, se observó un incremento en la actividad de AIAT y una disminución en la actividad de GDH. Con relación a las proteinasas se observó un marcado aumento en su actividad con la edad del cultivo (124% a 7 días y 231% a 14 días, comparados con los parásitos de 4 días). En epimastigotes que promovieron la fusión de GR el aumento fue del 25%. Estos cambios nos llevaron a preguntarnos si existirían modificaciones selectivas en el contenido de aminoácidos en dichos parásitos. La determinación de los mismos se realizó por cromatografía gaseosa. Se detectaron Ala, Arg, Glu, Gly, Ile, Leu, Lys, Phen, Pro, Ser, Tyr, Val. El aminoácido más abundante fue Ala en todas las muestras ensayadas y fue el único aminoácido cuya concentración disminuyó con la edad del cultivo. En los otros aminoácidos detectados se observaron aumentos que van desde un 27% (Ser) a un 147% (Glu) y 184% (Lys). El decaimiento de Ala con la edad del cultivo se correlacionaría con la disminución en la actividad de AIAT así como, el aumento en la cantidad de Glu con el incremento en la actividad de GDH. Por el contrario, en parásitos que promovieron la fusión de GR, se observó una marcada disminución en la concentración de Pro, Glu, Ala, Ser, Tyr y aminoácidos ramificados (50% a 60%), mientras que hubo un importante incremento en las concentraciones de Arg (73%) y Gly (190%). El aumento de la Arg podría deberse a su producción a partir del fosfágeno fosfoarginina con formación de ATP (reacción catalizada por arginino quinasa), a fin de proveer energía en los casos donde hay baja disponibilidad de sustratos. El aumento de Gly podría estar relacionado con su síntesis a partir de CO_2 y NH_3 .

BBM179. La fostatidilinositol-fosfolipasa C recombinante de *Trypanosoma cruzi* es activa para inositolfosfoceramida. SALTO ML, DOCAMPO R*, LEDERKREMER RM.

*CIHIDECAR. Dpto. de Química Orgánica, Fac. Cs Exactas y Naturales (UBA) Buenos Aires, Argentina. *Department of Pathobiology, College of Veterinary Medicine, University of Illinois, Urbana-Champaign, USA. lederk@qo.fcen.uba.ar*

Recientemente se describió la clonación de un gen de *Trypanosoma cruzi* y la expresión de la proteína (TcPI-PLC) con características similares a la PI-PLC tipo δ de mamíferos (Furuya *et al*, 2000 *J. Biol. Chem.* 275, 6428-6438). La enzima se activaba en la diferenciación de trypomastigotes a amastigotes. Por otra parte, en trabajos anteriores demostramos que durante esta diferenciación hay un aumento de la ceramida endógena en los amastigotes (Bertello *et al*, 1996, *Mol. Biochem. Parasitol.* 79, 143-151). Uno de los objetivos del presente trabajo es comparar la actividad de TcPI-PLC con respecto a PI e IPC purificados de *T. cruzi*. Se utilizaron los inositolfosfolípidos de células incorporadas con [^3H]-palmitico o [^3H]-inositol. La incubación de [^3H]-IPC con la enzima recombinante liberó toda la [^3H]-ceramida en 90 min, como se observó por cromatografía en capa delgada. Se determinó la velocidad comparativa de la reacción enzimática para PI e IPC utilizando distintas concentraciones de calcio, representativas del medio intra y extra celular. Se calcularon los siguientes valores: $\text{km PI}=4.4 \times 10^{-5} \text{ M}$ y $\text{km IPC}=7 \times 10^{-5} \text{ M}$ para $[\text{Ca}^{2+}]=10 \mu\text{M}$. A mayores $[\text{Ca}^{2+}]=1 \text{ mM}$ se obtuvo $\text{km PI}=2.05 \times 10^{-5} \text{ M}$ y $\text{km IPC}=5.9 \times 10^{-5} \text{ M}$. Estos resultados indi-

can que PI es mejor sustrato que IPC para la TcPI-PLC. La capacidad de liberar el lípido de glicoinositolfosfolípidos y mucinas previamente marcadas con [^3H]-palmitico se comparó con la de PI-PLC bacteriana. Se encontró que la velocidad de hidrólisis con la enzima recombinante es mucho menor que con la PI-PLC de *B. cereus*. La acción de los lípidos endógenos en la diferenciación se confirmó por incubación de trypomastigotes con PLC bacteriana. La observación de las células tratadas por microscopía electrónica mostró características estructurales de amastigotes.

BBM180. Caracterización de la proteína relacionada a la Cdc2p, CRK3, en *T. cruzi*. SANTORI MI, GOMEZ EB, MUÑOZ MJ y TÉLLEZ IÑÓN MT.

INGEBI (UBA, CONICET) Buenos Aires, Argentina. msantori@dna.uba.ar

Las quinasas dependientes de ciclinas (CDKs) son elementos esenciales en el control del ciclo celular eucariota. La actividad de estas quinasas está regulada por eventos de fosforilación y desfosforilación, así como por la asociación a ciclinas e inhibidores de CDKs. En distintos organismos se han descrito proteínas relacionadas a la Cdc2p, Cdc2p-Related Kinases (CRKs), por homología de secuencia sin poder asignarles una función clara en el control del ciclo celular. Numerosas CRKs han sido descritas en tripanosomátidos. Sin embargo, no se ha establecido claramente su función. En nuestro laboratorio se han clonado dos quinasas relacionadas a la Cdc2p: TzCRK1 y TzCRK3. Ensayos de Western blot empleando un antisuero policlonal, revelan la presencia de la proteína en distintas fracciones subcelulares del parásito. Se observaron diferencias tanto en el patrón de migración como en la localización subcelular de la quinasa, en los distintos estadios del parásito. A partir del suero total específico, se purificaron IgGs. Estas fueron usadas en ensayos de inmunoprecipitación de extractos solubles de epimastigotes. Los complejos inmunoprecipitados presentaron actividad de quinasa de histona H1. Los inhibidores específicos de CDKs, Olomoucina, Flavopiridol y Roscovitina, anularon la actividad quinasa inmunoprecipitada

BBM181. *Trypanosoma cruzi*: DAG-k, PA-k y señal de Ca^{2+} en epimastigotes estimulados con un péptido portador de la secuencia 1-40 de la α^D globina de pollo. SANTANDER V, BOLLO M y MACHADO-DOMENECH E.

Dpto. Biología Molecular. FCEFQN. UNRC. Río Cuarto. emachado@exa.unrc.edu.ar.

En nuestro laboratorio se demostró la capacidad de *Trypanosoma cruzi* de responder a un péptido sintético, portador de la secuencia 1-40 de la α^D globina de pollo mediante aumentos de inositol trifosfato (IP3) (*Cell. Mol. Biol.*, 1996, 42, 6: 859-864); esto fue revertido por TPA, éster de forbol activador no fisiológico de PKC. Por otro lado, Fraindenraich y col. (*Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1993, 90: 10140-10144) informaron que el mismo fragmento fue capaz de inducir, *in vitro*, la metaciclógenésis del parásito y de estimular su actividad de adenilato ciclasa. Para continuar el estudio de la respuesta de *T. cruzi* frente al péptido 1-40 nos propusimos investigar posibles cambios en las actividades lípido quinasa y en la señal de calcio. Para ello, se utilizaron formas epimastigotes de *T. cruzi* de 6 días de cultivo. Las actividades lípido quinasas se determinaron por incorporación de fosfato γ radioactivo desde el [$\gamma\text{-}^{32}\text{P}$]ATP a sustratos endógenos. Para medir la concentración de calcio

intracelular ($[Ca^{2+}]_i$) las células se cargaron con Fura 2-AM y se llevaron a cabo registros de fluorescencia. Cuando los parásitos se estimularon con péptido 1-40 se observó un aumento en los productos de diacilglicerol quinasa (DAG-k) y fosfatidato quinasa (PA-k) en una manera dosis-dependiente. Si bien la actividad de la DAG-k se observó a tiempos más cortos que la PA-k, ésta última perduró más en el tiempo, lo cual se correlaciona con el aumento observado en los niveles de IP3. El mismo estímulo también provocó una elevación rápida en la $[Ca^{2+}]_i$ independiente de calcio externo. Cuando las células fueron preincubadas con TPA, las elevaciones de $[Ca^{2+}]_i$ disminuyeron sólo un 50 %. Es decir, la activación de PKC inhibiría la producción de IP3 a tiempos cortos pero no las variaciones de calcio intracelular; este hecho podría indicar la existencia en epimastigotes de un mecanismo alternativo al aumento de IP3 para liberar calcio desde organelas.

BBM182. Diferencias y similitudes entre la tirosina aminotransferasa (TAT) de *Trypanosoma cruzi* y la enzima homóloga de hígado de mamíferos. GABARAIN C, SOBRADO V, MONTEMARTINI-KALISZ M, KALISZ K, HECHT HJ Y NOWICKI C.

Fac. de Farmacia y Bioquímica, UBA, Buenos Aires, Argentina y Gesellschaft für Biotechnologische Forschung, Braunschweig, Alemania.
cnowicki@criba.edu.ar

La familia de las aminotransferasas comprende numerosas enzimas con diferentes especificidades de sustrato y baja homología de secuencia (15-25%). En cuanto a las estructuras 3-D, las más estudiadas son las aspartato aminotransferasas (ASATs) en las cuales los residuos de arginina 292 y 386 unen mediante puentes de hidrógeno a sus sustratos específicos, los aminoácidos dicarboxílicos. En este sentido es poca la información disponible para aminotransferasas con otra especificidad de sustrato. *Trypanosoma cruzi* posee una TAT que utiliza aminoácidos aromáticos, alanina, metionina y leucina pero no transamina aminoácidos dicarboxílicos. El piruvato y 2-oxoisocaproato son los principales aceptores del grupo amino una vez formada la PMP-enzima aunque el oxalacetato y el 2-oxoglutarato también son utilizados. La TAT de *T. cruzi* presenta un 40.5% de identidad con la TAT de hígado de mamíferos, diferenciándose ésta por su marcada especificidad para el par tirosina / 2-oxoglutarato. Ambas TATs comparten además algunas propiedades fisicoquímicas evidenciadas en sus espectros de absorbancia, dicroísmo circular y resistencia a la digestión con tripsina en condiciones nativas, distinguiéndose en este sentido de las ASATs. Por otra parte, la TAT de *T. cruzi* posee una estructura 3-D que muestra un sitio activo con notorias diferencias respecto al de estas últimas. Los residuos de arginina que ambas enzimas poseen en la región de la Arg292 de las ASATs se mutaron por Glu en la TAT de *T. cruzi* y por Lys en la de mamíferos. La mutante Arg283Glu mantuvo las mismas constantes cinéticas que la enzima natural, en cambio la Arg315Lys resultó completamente inactiva. Estos resultados sugieren que a pesar de las similitudes observadas, la Arg 283 de la TAT de *T. cruzi* no participa en la catálisis mientras que en la TAT de mamíferos, al igual que en las ASATs, sería indispensable la presencia de un grupo guanidino en dicha posición. Esta observación constituye una primera aproximación tendiente a explicar las diferencias en la especificidad de sustrato de ambas enzimas la cual se refleja en su distinta función biológica

BBM183. Purificación y localización subcelular de una fosfolipasa A1 lisosomal de *Trypanosoma cruzi*. WAINSELBAUM M¹, ISOLA E¹, LAMMEL E¹, CANNATA J², FLORIN-CHRISTENSEN J³, FLORIN-CHRISTENSEN M³.

¹Dpto de Microbiología, Fac. Medicina, UBA. ²Centro de Investigación Bioenergética, CONICET-UBA, ³Instituto de Neurociencia, CONICET-UBA. Buenos Aires, Argentina. paradife@fmed.uba.ar

Las enzimas fosfolipasas tienen un rol importante en los procesos de multiplicación, diferenciación y patogénesis, como generadoras de 2^{dos} mensajeros (diacilglicerol, fosfolípidos y ácidos grasos) y en la remodelación celular durante la morfogénesis. En los tripanosomas africanos se han detectado fosfolipasas A1 que hidrolizan fosfatidilcolina y se ha demostrado su implicancia en patogénesis, y la de los ácidos grasos que generan. En *Trypanosoma cruzi*, las fosfolipasas A1 tienen interés debido a que la respuesta inflamatoria, rodeando los nidos de amastigotes en degeneración en tejidos de pacientes chagásicos sugiere que la autólisis genera factores causantes de inflamación. Se ha reportado que ácidos grasos y lisofosfolípidos liberados por tripomastigotes de *T. cruzi* muertos tienen efectos tóxicos en células de cultivo. Anteriormente se había detectado una fosfolipasa A1 que hidrolizaba fosfatidilcolina en todos los estadios parasitarios. Estudios de localización subcelular por congelamiento-descongelamiento y sonicación y por permeabilización selectiva con digitonina, demostraron que la enzima era liberada junto con cruzipaina y α -manosidasa, marcadores lisosomales y con diferente comportamiento de las citosólicas, glicosomales o mitocondriales. Esta fosfolipasa A1 se purificó por cromatografías de intercambio iónico y de afinidad. La cromatografía en columnas de Sephadex G-75, mostró un peso molecular de 40 kDa. Homogenatos de epimastigotes, tripomastigotes y amastigotes mostraron una casi completa deacilación de fosfolípidos endógenos con acumulación de ácidos grasos libres y lisocompuestos. Estos resultados sustentan la hipótesis de que estos lípidos podrían contribuir al proceso inflamatorio observado en los nidos de amastigotes en procesos degenerativos. Este trabajo recibió apoyo financiero de UBA, CONICET y UNDP/WORLD BANK/WHO Special Programme for Research in Tropical Diseases (TDR)

BBM184. Participación de GTPasas Rab 5 y Rab 7 en la interacción *Trypanosoma cruzi*-células no fagocíticas. WILKOWSKY SE, BARBIERI MA*, BELAUNZARAN ML, STAHL PD*, ISOLA ED.

Dpto. de Microbiología, Fac. de Medicina, UBA, Bs. As., Argentina. *Dept. Cell Biol. and Physiol., Washington University School of Medicine, St. Louis, MO, USA. paradife@fmed.uba.ar

Las proteínas Rab son GTPasas pequeñas que regulan diferentes pasos del transporte vesicular. Específicamente la proteína Rab 5 regula la fusión entre endosomas tempranos y Rab 7 la de endosomas tardíos. Para determinar la participación de Rab 5 y 7 en la invasión de células no fagocíticas por *T. cruzi*, se construyeron líneas celulares transfectadas que sobreexpresan ambas proteínas en su forma nativa y mutantes con actividad GTPasa positiva y negativa por técnicas de biología molecular. Los fragmentos fueron subclonados en el vector pcDNA3.1/Hygro por PCR. Las construcciones se secuenciaron para confirmar la exactitud de las mutaciones. Se transfectaron células CHO con

lipofectina y las transfectantes positivas se seleccionaron en medio con Hygromicina. La sobreexpresión de las proteínas transfectadas se confirmó por Western blot. Los experimentos de infección con *T. cruzi* en estas células, mostraron una correlación entre proteínas Rab activas y mayores porcentajes de invasión así como una inhibición significativa de la invasión en las mutantes negativas comparando los resultados con los de infección en células wild type. Esto se evidenció claramente por microscopía confocal, donde se destaca la colocalización de las proteínas Rab 5 y 7 con los parásitos en las células infectadas. En síntesis, durante el proceso de invasión del *T. cruzi*, los tripomastigotes utilizan tanto compartimentos Rab 5 positivos (endosomas tempranos) como compartimentos Rab 7 positivos (endosomas tardíos) indicando que los parásitos intervienen en los caminos de transporte vesicular de las células para su establecimiento en el citosol hospedador. El éxito de la invasión parasitaria entonces, estaría dependiendo de la actividad enzimática de estas proteínas Rab ya que las mutantes negativas (que no unen GTP) son ineficientemente invadidas por los parásitos. Este trabajo recibió apoyo financiero de UBA, CONICET y UNDP/World Bank/WHO-TDR

BBM185. *Trypanosoma cruzi* trypanothione reductase is inactivated by peroxidase-generated phenothiazine cationic radicals. GUTIERREZ-CORREA J¹, FAIRLAMB AH², STOPPANI AOM¹.

¹Centro de Investigaciones Bioenergéticas, Fac. de Medicina (UBA-CONICET) Buenos Aires, Argentina.

²Division of Molecular Parasitology and Biological Chemistry, Department of Biochemistry, University of Dundee, United Kingdom. stoppani@mail.retina.ar

Trypanosoma cruzi trypanothione reductase (TR) was irreversibly inhibited by peroxidase/H₂O₂/phenothiazine (PTZ) systems. TR inactivation depended on (a) time of incubation with the phenothiazine system; (b) the peroxidase nature and (c) the PTZ structure and concentration. With the most effective systems, TR inactivation kinetics was biphasic, with a relatively fast initial phase during which about 75% of the enzyme activity was lost, followed by a slower phase leading to total enzyme inactivation; GSH prevented TR inactivation by the peroxidase/H₂O₂/PTZ⁺ systems. Production of PTZ⁺ cation radicals by PTZ peroxidation was essential for TR inactivation. Horseradish peroxidase, leukocyte myeloperoxidase (MPO) and the pseudo-peroxidase myoglobin (Mb) were effective catalyzers of PTZ⁺ production. Promazine, thioridazine, chlorpromazine, propionylpromazine prochlorperazine, perphenazine and trimeprazine were effective constituents of the HRP/H₂O₂/PTZ system. The presence of substituents at the PTZ nucleus Position 2 exerted significant influence on PTZ activity, as shown by the different effects of 2-trifluoromethyl and 2-H or 2-chlorophenothiazines. The PTZ⁺ cation radicals disproportionation regenerated the non-radical PTZ molecule and produced the PTZ sulfoxide that was inactive on TR. Thiol compounds including GSH interacted with PTZ⁺ cation radicals transferring the free electron from the PTZ⁺ to the sulfide anion, thus nullifying the PTZ⁺ biological and chemical activities.

BBM186. Efecto de las poliaminas sobre la acción antiproliferativa de sueros chagásicos en epimastigotes de *Trypanosoma cruzi*. HERNANDEZ S*, KOLLIKER FRERS R**, SANCHEZ M*, RAZZITTE G**, PALACIOS J**, BERENSTEIN F**, SCHWARCZ M*.

*Dpto Bioquímica Humana, Facultad de Medicina, UBA, **Hospital J.M. Ramos Mejía, Buenos Aires, Argentina. bhp01@fmed.uba.ar

Sueros de pacientes diagnosticados como chagásicos - seropositivos por IFI, ELISA, HAI y aglutinación por partículas- tienen un efecto antiproliferativo sobre epimastigotes de *Trypanosoma cruzi*, cepa RA, cuando se agregan al medio de cultivo. Este efecto se produce independientemente de que se utilicen sueros 1) de pacientes asintomáticos o con manifestaciones cardíacas 2) completos o desprovistos de anticuerpos específicos. No se produce con sueros provenientes de individuos normales o con alteraciones cardíacas no chagásicas. Considerando que la espermina, es necesaria para la replicación normal del *T. cruzi*, el objetivo de este trabajo es estudiar si las poliaminas están involucradas en la acción antiproliferativa de los sueros. Los resultados indican que los sueros chagásicos no modifican el contenido de poliaminas de los parásitos y que el efecto antiproliferativo se produce en forma similar en parásitos cultivados en un medio a) libre de poliaminas, b) que contiene concentraciones micromolares de poliaminas y c) suplementado con éster de forbol capaz de estimular la proliferación de los parásitos por un mecanismo que involucra un aumento de espermina endógena. Por el contrario, el agregado de espermidina y espermina 1 o 2 mM al medio de cultivo protege de la acción de los sueros. Este efecto es específico dado que no lo producen putrescina, cadaverina ni cationes inorgánicas como Ca⁺⁺ o Fe⁺⁺ a 4 mM. Podemos concluir que el efecto antiproliferativo de los sueros chagásicos no se relaciona con alteraciones de los niveles de poliaminas endógenas. Sin embargo concentraciones milimolares de las poliaminas exógenas tienen un efecto protector sobre la acción de los sueros. Sugerimos que las poliaminas, interactuando con moléculas cargadas negativamente en la superficie de la membrana de los parásitos, pueden interferir con la unión de los componentes del suero responsables del daño celular.

BBM187. La vía de las pentosas fosfato en *Trypanosoma cruzi* y *Leishmania mexicana*. MAUGERI D, IGOILLO ESTEVE M Y CAZZULO JJ.

Instituto de Investigaciones Biotecnológicas, Universidad Nacional de General San Martín, 1650 San Martín, Buenos Aires, Argentina.

En muchos organismos la glucosa es catabolizada a través de dos vías principales, la vía glicolítica de Embden y Meyerhof (EM), cuya finalidad es energética, y la vía de las pentosas fosfato (PP), cuya finalidad es biosintética, a través de la producción de ribosa-5P para la síntesis de ácidos nucleicos y NADPH para vías biosintéticas reductivas. Se ha sugerido también que el NADPH generado por el PP podría jugar un papel importante en la protección contra el stress oxidativo en algunos Protozoarios. El papel que juega el PP en los Trypanosomatidos no está aún bien definido, y la vía ha sido muy poco estudiada, a diferencia de la EM, tanto en *Trypanosoma cruzi* como en *Leishmania* spp. Hemos comenzado una evaluación de la presencia y relevancia del PP en *T. cruzi* y *L. mexicana*, tanto en condiciones basales como de stress oxidativo. Según experimentos metabólicos llevados a cabo con glucosa marcada con ¹⁴C en C1 o C6, la PP es operativa en ambos parásitos, y el consumo de glucosa a través de la misma aumenta de 2 a 4 veces en condiciones de stress oxidativo inducido por azul de metileno 0.2 mM. Experimentos de localización subcelular con digitonina sugieren que todas las enzimas del PP, de-

tectadas en ambos parásitos, son esencialmente citosólicas, con una probable localización glicosomal muy minoritaria en algunos casos. Estamos purificando la glucosa-6PDH y la 6-PgluconatoDH de *T. cruzi*, cepa Tul 2, para completar su caracterización. Estos estudios se han visto dificultados por la marcada inestabilidad de ambas enzimas.

BBM188. Caracterización parcial de las propiedades cinéticas de TgPI, un inhibidor de serin proteasas de *Toxoplasma gondii*. V.PSZENNY, B.LEDESMA, V.DUSCHAK*, E.GUARNERA, J.CAZZULO*, E.BONTEMPI Y S.ANGEL.

*Instituto Nacional de Parasitología Dr. Mario F. Chaben. A.N.L.I.S. Av. Velez Sarsfield 563,1426. *Instituto de Investigaciones Biotecnológicas. UNSAM. San Martin, Argentina. vseni@ciudad.com.ar*

TgPI es un inhibidor de serin proteinasas tipo Kazal de *Toxoplasma gondii* recientemente clonado, secuenciado y expresado en *E.coli*, en nuestro laboratorio. Esta molécula posee cuatro dominios con alto grado de similitud con los inhibidores tipo Kazal. Los dos primeros dominios poseen sitios reactivos para inhibición de tripsina y triptasa y los dos segundos para elastasa. Utilizando la estrategia de Bieth (Methods in Enzymology, vol 248:59-83. 1995) se demostró que la cinética de inhibición de TgPI corresponde a la de los inhibidores no clásicos reversibles que forman complejos de estrecha unión con sus correspondientes proteasas. La capacidad inhibitoria de TgPI sobre diferentes serin proteasas se demostró por medición de la actividad residual sobre sustratos cromogénicos adecuados en presencia de diferentes cantidades de inhibidor. TgPI inhibe tripsina, triptasa, elastasa y trombina. La constante de inhibición de 0.6 nM para el complejo TgPI -tripsina fue calculada ajustando las velocidades en el equilibrio a la ecuación de Morrison mediante análisis de regresión no lineal. Dos fragmentos del gen TgPI conteniendo cada uno de ellos las secuencias codificantes para una de las dos especificidades fueron clonados y expresados por separado. Se demostró que la trombina es inhibida por los dominios correspondientes a tripsina/triptasa, mientras que los dominios para elastasa no ejercen efecto inhibitorio alguno sobre esta proteasa. Ensayos de inmunofluorescencia sobre extendidos de taquizoitos, con un anticuerpo policlonal anti-TgPI mostraron un patrón de marcación compatible con proteínas de los micronemas. Estos resultados junto con la detección de TgPI en sobrenadantes de cultivo (mediante experimentos de inmunoblot) sugieren que esta proteína es de secreción. Se requieren estudios más completos para determinar la verdadera localización, así como también para dilucidar el rol que TgPI cumple en la biología de *T.gondii*.

BBM189. Efecto del bromuro de etidio y de naftoquinonas sobre la ultraestructura y la fosforilación oxidativa en *Crithidia fasciculata*. BISCARDI AM¹, LOPEZ LM², MARDYKS DE PAHN E¹, PELLEGRINO DE IRALDI A², STOPPANI AOM¹.

¹Centro de Investigaciones Bioenergéticas, Fac. de Medicina (UBA-CONICET) Buenos Aires, Argentina..

²Departamento de Biología Celular y Neurociencias, Fac. de Medicina (UBA-CONICET). stoppani@mail.retina.ar

El bromuro de etidio (EB) es un agente intercalante que liga específicamente el ADN del cinetoplasto mitocondrial de los tripanosomatídeos (k-ADN) inhibiendo la replicación del mismo, lo que causa la discinetoplastia. En los organismos eucariotes, el ADN mitocondrial codifica la información

genética para la síntesis de los citocromos b, aa₃ y la ATPase F₀F₁, lo que justifica la investigación de efectos similares en *C. fasciculata*, un tripanosomatídeo utilizado para estudios sobre agentes quimioterápicos específicos. El cultivo de *C. fasciculata* en presencia de EB determinó la inhibición del crecimiento del organismo y la producción de discinetoplastia, demostrada por las alteraciones de la ultraestructura del cinetoplasto, que apareció fuera de lugar con modificaciones en la matriz y las membranas. La discinetoplastia se manifestó por la disminución de la respiración y de la fosforilación oxidativa, expresada por el nivel de ATP y de los parámetros específicos, a saber, la relación ATP/ADP y el potencial de nucleotidos. Efectos directos de EB sobre esos parámetros se descartaron porque EB no actuó sobre criticidias en fase estacionaria de crecimiento. La o-naftoquinona lipofílica β-lapachona también produjo alteraciones en la ultraestructura del cinetoplasto de *C. fasciculata*, en particular de las membranas mitocondriales que correlacionaron con alteraciones de la fosforilación oxidativa, confirmando así el efecto de EB. El efecto de β-lapachona implicó a radicales libres del oxígeno pues fue prevenido por antagonistas específicos.

BBM190. Presencia de una proteína-cobamida en el tripanosomatídeo *Crithidia fasciculata*. CATALANO PN, CAPELLUTO D, CAZZULO JJ*, CANNATA JJB.

*Centro de Investigaciones Bioenergéticas (CIBIERG), Fac. de Medicina, UBA-CONICET, Buenos Aires; *Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional de General San Martín, Pcia. de Buenos Aires, Argentina. jcannata@fmed.uba.ar.*

Hemos podido detectar la presencia en el tripanosomatídeo *C. fasciculata*, de una proteína asociada a una de las denominadas coenzimas B12. La misma ha sido purificada hasta casi homogeneidad proteica mediante un protocolo que incluye sucesivas cromatografías en columnas de DEAE-celulosa, fenil sepharosa e hidroxilapatita. El peso molecular de la proteína nativa determinado por el método de Andrews utilizando una columna convenientemente calibrada de BiosilSEC 250 fue de 15.1 kD el cual coincide con el determinado por SDS-PAGE. La proteína purificada exhibe el intenso y característico color rosado de este tipo de proteínas y presenta un espectro de absorción con un máximo prominente a 412 nm. y otros dos menores a 525 y 555 nm. respectivamente. Si bien todavía no ha podido ser identificada, su sola presencia en dicho microorganismo reviste particular interés, dado que es la primera vez que se informa la existencia de una proteína-cobamida en un tripanosomatídeo.

BBM191. Expresión de un ADN copia codificante para una región de la proteína de choque térmico Hsp90 de *Toxoplasma gondii* y análisis de su valor antigénico. ROJAS PA, PSZENNY V, GUARNERA E y ANGEL SO.

Instituto Nacional de Parasitología Dr. Mario F. Chaben/ANLIS Dr. Carlos G. Malbran, Departamento de Parasitología Sanitaria, Av. Velez Sarsfield 563, 1426-Buenos Aires, Argentina.

En este trabajo se caracterizó el ADN copia codificante para una región de la proteína de choque térmico HSP90 del *Toxoplasma gondii*. El análisis de la secuencia nucleotídica demostró que el ADN copia codifica para 137 aminoácidos correspondientes al extremo C-terminal de la proteína. Mediante un ensayo de Southern blot se comprobó que el gen

es de copia única. Se generó una proteína recombinante (rTgHSP90) de 18-kDa que fue purificada a partir de cultivos de *Escherichia coli*, y con la cuál se obtuvo un suero policlonal anti-rTgHSP90 en conejo. Dicho suero reconoció por Western blot una proteína de 90-kDa en un homogenato total de taquizoitos de *T. gondii*. Se analizó la respuesta humoral anti-rTgHSP90 producida por ratones de la cepa Balb/c (resistente a la formación de quistes) y C57BL/6 (susceptible) infectados oralmente con quistes de *T. gondii*, observándose en ambos grupos la presencia de anticuerpos específicos a la décima semana posterior a la infección, etapa crónica de la infección. El análisis de los isotipos de IgGs anti-rTgHSP90 demostró una predominancia de IgG2a e IgG3 para Balb/c y de IgG1 para C57BL/6. Se analizaron sueros humanos de individuos seronegativos, con infección crónica y con posible infección aguda. El análisis demostró que la relación de los niveles de IgG anti-rTgHSP90/IgG anti-*T. gondii* era mayor en el grupo de los crónicos que en el grupo de los potenciales agudos, mientras que los sueros negativos nomostraban reactividad. Se concluye que la región C-terminal de la hsp90 del *T. gondii* podría ser un marcador de infección crónica y podría estar implicada en el proceso inmutagenético de la infección.

BBM192. Identificación de una proteína de unión a ADN involucrada en la expresión de genes específicos durante el enquistamiento del protozooario intestinal *Giardia lamblia*. NORES MJ, TOUZ, MC, LUJAN, HD.

Cátedra de Química Biológica, Facultad de Ciencias Médicas. Universidad Nacional de Córdoba. Argentina. hlujan@biomed.uncor.edu.

Giardia lamblia es un protozooario que habita en el intestino delgado de vertebrados. Dentro del intestino algunos trofozoitos se transforman en quistes, la forma infectiva del parásito, que se liberan con las heces y son los responsables de la transmisión de la enfermedad. Los trofozoitos de *Giardia* son incapaces de sintetizar colesterol y deben captar esta molécula del lumen del intestino superior. Así, el enquistamiento de *Giardia* se manifiesta como un mecanismo de adaptación celular a la falta de colesterol que ocurre en las partes más bajas del intestino. Este proceso consiste en la producción, procesamiento y transporte de los componentes de la pared del quiste para su posterior secreción y ensamblado en una cubierta extracelular que protege al parásito fuera del intestino. Nuestra estrategia para estudiar la regulación de la expresión génica durante el enquistamiento se basó en la producción de anticuerpos contra trofozoitos en proceso de enquistamiento y componentes de la pared del quiste. De este modo identificamos y caracterizamos varios genes, entre ellos dos que codifican para proteínas de la pared del quiste, *cwp1* y *cwp2*. En este trabajo realizamos el escrutinio de una genoteca de expresión de ADN complementario, generada a partir de ARN extraído de trofozoitos inducidos a enquistarse por diferentes periodos, utilizando: (a) anticuerpos policlonales generados contra trofozoitos en proceso de enquistamiento y (b) fragmentos de 120 pb marcados radioactivamente correspondientes a las regiones 5' no transcritas de los genes *cwp1* y *cwp2*. Con ambas estrategias identificamos una proteína que une ADN y que es codificada por un gen previamente caracterizado en *Giardia* (ORF-C4) cuya función era desconocida. Ensayos de Northern blots demostraron que la expresión de este gen se induce de manera similar a *cwp1* y *cwp2* durante el enquistamiento y que codifica una protei-

na de 22 kDa que, aunque no presenta alta homología con otras proteínas conocidas, posee dominios presentes en proteínas involucradas en la regulación de la expresión génica en otros organismos, tales como supresina, myc y DEAF-1. Estudios en curso nos permitirán determinar la función de esta proteína en el mecanismo de control de la transcripción mediado por colesterol durante la diferenciación de *Giardia*.

BBM193. Identificación y caracterización de una proteína de gránulos de secreción (GSP) que es específicamente expresada durante el enquistamiento del eucariota primitivo *Giardia lamblia*. TOUZ MC, NORES MJ, KEDIKIAN VG, SAURA A, LUJAN HD.

Cátedra de Química Biológica, Facultad de Ciencias Médicas. Universidad Nacional de Córdoba. Argentina. hlujan@biomed.uncor.edu.

Para sobrevivir fuera del intestino del huésped los trofozoitos de *G. lamblia* sufren importantes cambios diferenciándose a quistes. Los trofozoitos carecen de aparato de Golgi y de gránulos de secreción pero durante el enquistamiento se observa la biogénesis de estas organelas, que precede a la formación de una pared extracelular protectora para el parásito. Nuestro objetivo es determinar los mecanismos bioquímicos y genéticos involucrados en la formación de los gránulos y en el transporte y secreción de las proteínas que participan en este proceso. Previamente identificamos dos proteínas (CWP1 y CWP2) que son transportadas dentro de los gránulos en trofozoitos en proceso de enquistamiento y que luego son secretadas para formar la pared del quiste. En este trabajo identificamos una nueva molécula cuya expresión se induce durante el enquistamiento, pero que se encuentra únicamente en los gránulos de secreción. Dos anticuerpos monoclonales (7E7 y 9C3) generados contra gránulos purificados reconocen proteínas de ~54 y ~23 kDa que se inducen de forma similar a CWP1 y CWP2. El escrutinio de una genoteca de ADN complementario con esos anticuerpos permitió identificar tres clones. Experimentos de Southern blots mostraron bandas de idéntico peso molecular al utilizar como sondas los insertos de estos clones. El hecho de que 7E7 y 9C3 reconocieran proteínas de similar peso molecular de idéntica cinética de inducción, la ubicación subcelular común y el patrón en Southern blots indicó que estos fragmentos pertenecerían a un mismo gen, lo que fue corroborado por PCR. Mediante el escrutinio de una genoteca de ADN genómico y el secuenciamiento de los clones obtenidos se logró la secuencia completa de este gen, el cual predice una proteína de 54 kDa, GSP, que no muestra homología significativa con ninguna otra proteína conocida. Sin embargo, GSP presenta dominios involucrados en la regulación de la concentración de calcio y en el metabolismo de polifosfoinositoles, por lo que esta molécula podría ser importante en el control del mecanismo de exocitosis y/o en el mantenimiento de las CWPs en forma soluble dentro de los gránulos de secreción.

BBM194. Defosforilación de proteínas de la pared del quiste (CWP1 y CWP2) mediada por una fosfatasa ácida lisosomal es requerida para el desenquistamiento de *Giardia lamblia*. SAURA A, CARRILLO RM, LUJÁN HD.

Cátedra de Química Biológica, Facultad de Ciencias Médicas. Universidad Nacional de Córdoba. Argentina. hlujan@biomed.uncor.edu.

Giardia lamblia es un organismo unicelular causante de enfermedad intestinal en humanos y otros vertebrados. La infección se inicia por la ingestión de los quistes, los cuales inician el desenquistamiento inducidos por el medio ácido del estómago y lo completan por acción de las proteasas intestinales, liberando trofozoítos que se multiplican y colonizan el intestino. *Giardia* posee vesículas periféricas (VP) con actividad hidrolítica que se cree son lisosomas, pero cuya verdadera función es foco de controversia. Estudios de otros autores demostraron que durante el desenquistamiento *in vitro* existe liberación del contenido de las VP al espacio presente entre la pared quística y la membrana plasmática del trofozoito, incluyendo actividad de fosfatasa ácida (AcPh). El presente trabajo fue diseñado para verificar la hipótesis de que la actividad de esta enzima estaba involucrada en el proceso de desintegración de la pared quística. El proceso de desenquistamiento se puede realizar *in vitro* por incubación de los quistes en medio ácido (inducción) y posterior tratamiento con proteasas intestinales en medio ligeramente alcalino (desenquistamiento). Experimentos incluyendo [³²P] en el medio de enquistamiento demostraron que las proteínas de la pared del quiste CWP1 y CWP2 son fosforiladas durante el ensamblado de la pared. Determinamos que inhibidores de la actividad de AcPh durante la inducción bloqueaban la posterior acción de las proteasas sobre los componentes de la pared, inhibiendo de este modo la liberación de los trofozoítos y sugiriendo que en estado fosforilado las CWPs son resistentes a la degradación proteolítica. Por ello decidimos identificar el gen que codifica para AcPh. Sondas diseñadas utilizando regiones consenso de las enzimas conocidas en ensayos de PCR amplificaron un fragmento de ADN que luego fue purificado, marcado y utilizado en el escrutinio de una genoteca de ADN genómico. La secuencia obtenida indicó que este gen realmente codificaba una AcPh de 400 aminoácidos y de pI 5,5, homóloga a las AcPh lisosomal de varios organismos. Nuestros resultados sugieren que la inhibición la AcPh de *Giardia* puede ser un excelente mecanismo para impedir el desenquistamiento del parásito en el intestino y con ello anular el establecimiento de la infección.

BBM195. Identificación y caracterización de una dipeptidilpeptidasa necesaria para la expresión génica específica durante diferenciación a quiste de trofozoítos de *Giardia lamblia*. TOUZ MC¹, PIACENZA L², ACOSTA D², CARMONA C², LUJAN HD¹.

¹Cátedra de Química Biológica, Facultad de Ciencias Médicas. Universidad Nacional de Córdoba. Argentina. ²Instituto de Higiene. Universidad de la República. Montevideo, Uruguay. hlujan@biomed.uncor.edu.

El proceso de diferenciación celular en *Giardia lamblia* es un mecanismo de adaptación necesario para la supervivencia del parásito en medios hostiles. Este proceso comprende varias etapas perfectamente coordinadas, las cuales incluyen (a) la recepción del estímulo del enquistamiento, (b) el envío de esta señal a los núcleos del parásito y la activación de genes específicos, (c) la síntesis y transporte de los componentes de la pared y (d) la secreción y ensamblado de los mismos para formar la pared extracelular. Previamente identificamos dos glicoproteínas de la pared del quiste (Cyst Wall Protein 1 y 2) cuya expresión es inducida de forma similar durante el enquistamiento y co-localizan tanto en los gránulos de secreción específicos del proceso de enquistamiento como en la pared de quistes maduros. Uno

de los objetivos de nuestro grupo de trabajo es el estudio de los eventos involucrados en la expresión génica diferencial que ocurre en este proceso, particularmente el de las CWPs. Durante estudios de la participación de actividades proteolíticas en la diferenciación, observamos que cuando se agrega al medio de enquistamiento un inhibidor competitivo de aminopeptidasas (Bestatina) se inhibe la expresión de las CWPs, no se produce la biogénesis de los gránulos de secreción y no hay formación de quistes. Cuando analizamos el perfil proteico en SDS-PAGE de trofozoítos inducidos a enquistarse en presencia de Bestatina se observó el aumento de dos proteínas de ~87 y ~58 kDa. Estas proteínas fueron purificadas por afinidad a una columna de Bestatina, microsecuenciadas y con las sondas generadas se obtuvo la secuencia completa del gen. Este predice una proteína de 87 kDa (que contiene el péptido de 58 kDa), con un posible dominio transmembrana y que presenta una alta homología con dipeptidilpeptidasa IV. Los resultados obtenidos indican que esta enzima participaría en la regulación de la expresión génica diferencial que ocurre en el proceso de enquistamiento y que, al ser indispensable para la formación de la pared del quiste, puede ser un importante blanco para la acción de agentes terapéuticos que impidan la diferenciación y con ello la transmisión de este parásito.

BBM196. La actividad de una cisteín proteasa inducida durante el enquistamiento es indispensable para la formación de la pared del quiste del parásito intestinal *Giardia lamblia*. TOUZ MC, CORONEL CE, LUJAN HD.

Cátedra de Química Biológica, Facultad de Ciencias Médicas. Universidad Nacional de Córdoba. Argentina. hlujan@biomed.uncor.edu

Para sobrevivir fuera del intestino del huésped *Giardia lamblia* sufre un proceso de diferenciación llamado enquistamiento. Este proceso involucra la síntesis de proteínas que van a formar parte de la pared quística extracelular, la biogénesis de organelas secretorias encargadas de transportar estos materiales y el posterior ensamblado de los mismos en la pared del quiste. Previamente identificamos y caracterizamos dos proteínas que forman parte de la pared: CWP1 (26 kDa) y CWP2 (39 kDa). La expresión de estas proteínas aumenta durante el enquistamiento de forma similar, forman un complejo entre ellas y tienen una gran homología en una región de 26 kDa. La principal diferencia entre ellas es que CWP2 posee en su extremo C-terminal una extensión de 13 kDa rica en aminoácidos alcalinos que es responsable del "sorting" de estas proteínas a los gránulos de secreción. Un anticuerpo monoclonal que reconoce CWP2 detecta una proteína de 39 kDa en gránulos de secreción purificados pero sólo una proteína de 26 kDa en paredes purificadas, indicando que CWP2 sufre un procesamiento proteolítico durante la formación de la pared del quiste. Nuestros resultados indican que una cisteín proteasa intracelular unida a membrana, cuya actividad se incrementa durante el enquistamiento de manera similar a la de las CWPs, está involucrada en este procesamiento. Inhibidores de cisteín proteasas permeables a la membrana celular bloquean no solo el procesamiento proteolítico de CWP2 sino también la secreción de las CWPs y la formación de la pared del quiste. La purificación de esta proteasa, su microsecuenciación y el escrutinio en genotecas de ADN complementario y ADN genómico nos permitió obtener la secuencia completa del gen que la codifica. Esta proteasa, a la que llamamos ESCP (Encystation-Specific Cysteine-Protease), tiene homología

con Catepsina C lisosomal pero presenta un dominio transmembrana ausente en estas proteasas. Análisis de actividad indicaron que ESCP actúa específicamente sobre CWP2, lo que demostraría por primera vez la actividad endopeptidasa de una Catepsina C sobre un sustrato natural. Nuestros resultados demuestran que ESCP es la proteasa involucrada en el procesamiento de CWP2 y que la acción de esta enzima es indispensable para la formación de la pared del quiste.

BBM197. Identificación de un homólogo de Sintaxina involucrado en la secreción regulada de proteínas durante la formación de la pared del quiste en *Giardia lamblia*. TOUZ MC, NORES MJ, LUJAN HD.

Cátedra de Química Biológica, Facultad de Ciencias Médicas. Universidad Nacional de Córdoba. Argentina. hlujan@biomed.uncor.edu.

El enquistamiento en *Giardia* es un proceso de adaptación celular que exige la producción, procesamiento y transporte intracelular de los materiales constituyentes de la pared del quiste, los que posteriormente serán ensamblados en una estructura extracelular que protege al parásito fuera del intestino del huésped. En *Giardia*, los mecanismos que controlan el transporte intracelular de proteínas son poco conocidos. *Giardia* carece del aparato de Golgi, una organela fundamental para el transporte de materiales de secreción en eucariotas; sin embargo, el transporte, distribución y secreción de proteínas ocurre normalmente en este parásito. Durante la transformación del trofozoíto a quiste se induce la estructura y la función del aparato de Golgi, además de la aparición de gránulos de secreción específicos. El objetivo de nuestro trabajo es el de descifrar los eventos bioquímicos y moleculares que participan en el transporte intracelular de los materiales que forman la pared del quiste. Para ello desarrollamos anticuerpos monoclonales (mAb) contra paredes quísticas y gránulos purificados. Uno de esos mAb (3B5) reconoce un antígeno presente tanto en los gránulos de secreción como en la membrana plasmática de trofozoítos en proceso de enquistamiento. Esta proteína se encuentra en muy bajos niveles en trofozoítos no inducidos a enquistarse pero su expresión aumenta notablemente durante el enquistamiento. El escrutinio de una genoteca de ADN complementario utilizando el mAb 3B5 nos permitió identificar un clon cuyo inserto fue luego utilizado en el escrutinio de una genoteca de ADN genómico. La secuenciación de los clones obtenidos permitió conocer la secuencia del gen que codifica la proteína reconocida por este anticuerpo, el que mostró una muy alta homología con Sintaxina. Las Sintaxinas son una familia de proteínas que componen el complejo de fusión (SNARE) descrito en organismos más evolucionados. Siendo *Giardia* la célula eucariota más primitiva que se conoce, la presencia de Sintaxina y su participación en el mecanismo de secreción regulada que conduce a la formación de la pared del quiste en este organismo demuestra la gran conservación evolutiva de los procesos de transporte intracelular en células eucariotas.

BBM198. El contenido en cisteínas, la hidropatía y la aromaticidad, y finalmente la expresividad, son los principales factores que moldean la frecuencia de aminoácidos en *Giardia lamblia*. GARAT B, ROMERO H, MUSTO, H.

Sección Bioquímica, y Laboratorio de Organización y Evolución del Genoma; Facultad de Ciencias, Montevideo 11400, Uruguay. bgarat@fcien.edu.uy

Las frecuencias de aminoácidos de 75 genes completos de *Giardia lamblia* fue estudiada mediante análisis de correspondencia, y se encontró que hay tres factores principales que influyen en la variabilidad de la composición aminoácida en este parásito. Estos factores explican 50%, 12,8% y 7,5% de la varianza total, respectivamente. El primer factor se correlaciona en forma muy significativa ($R = .97, P < .0001$) con el contenido en Cys de cada proteína. Cuando las secuencias con más alto contenido en este aminoácido son excluidas del análisis, la correlación baja pero se mantiene altamente significativa. En segundo lugar, aunque la mayor parte de las proteínas disponibles de *G. lamblia* son hidrofílicas, encontramos que el segundo factor se correlaciona fuertemente con la hidropatía de cada secuencia ($R = .58, P < .0001$). Finalmente, el tercer factor en orden de importancia está determinado por la expresividad de cada gen, ya que la posición de las secuencias en este eje se correlaciona significativamente ($R = .55, P < .0001$) con la posición de los respectivos genes en el eje principal del RSCU (Relative Synonymous Codon Usage), el que fuera demostrado que discrimina entre genes de alta y baja expresión (Lafay y Sharp, *Mol Biol Evol* 16:1484-1495, 1999). Se discuten las implicaciones biológicas de estas tendencias de acuerdo a la biología de este organismo unicelular.

BBM199. Clonado y secuenciación del gen de la isoforma citosólica de malato deshidrogenasa (MDH) de *Trypanosoma brucei*. VERNAL J¹, MUÑOZ J⁴, MÜLLER M³, CAZZULO JJ² Y NOWICKI C.¹

¹Fac. de Farmacia y Bioquímica, UBA, ²Instituto de Investigaciones Biotecnológicas, Universidad Nacional de Gral. San Martín, Buenos Aires, Argentina. ³Biochemical Parasitology Laboratory, ⁴Molecular Parasitology Laboratory, Rockefeller University, NY, USA. cnowicki@criba.edu.ar

A diferencia de lo que se describió en *Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma brucei* posee una isoforma citosólica de MDH adicional a las isoenzimas glicosomal y mitocondrial. Estas dos últimas han sido clonadas y secuenciadas; en cambio no se posee ninguna información respecto a la MDH citosólica. Por otra parte, en los tripanosomas africanos, Stibbs y Seed detectaron un activo catabolismo de aminoácidos aromáticos, que se refleja en una abundante excreción de derivados aromáticos de lactato y piruvato. Estos metabolitos alcanzan altas concentraciones en la orina de los huéspedes mamíferos infectados. En *T. cruzi* es la deshidrogenasa de L- α -hidroxiácidos aromáticos (AHADH), una enzima vinculada a la familia de las MDHs, la responsable de la formación de los derivados aromáticos del ácido láctico. En cambio en los tripanosomas africanos no se identificó a la enzima responsable de la formación de estos catabolitos. Por estas razones encaramos la búsqueda de los genes que codificarían para una deshidrogenasa de L- α -hidroxiácidos aromáticos y para la MDH citosólica en *T. brucei*. Aquí presentamos la secuencia del gen que codifica para la cMDH y la caracterización de la proteína recombinante. Nos basamos en las secuencias de los bancos de datos vinculados al proyecto genoma de *T. brucei* que presentaban alta homología con la AHADH de *T. cruzi*. Empleando reacciones de retrotranscripción seguidas de PCR, se pudo obtener el marco de lectura abierto completo que codificaría para una proteína de 328 aminoácidos, con alta homología con cMDHs y 71% de identidad con la AHADH de *T. cruzi*. La expresión de la proteína recombinante en

cultivos de *E. coli* mostró que se trata de una típica MDH, con alta afinidad por oxaloacetato (Km de 20,2 μ M) e incapaz de reducir derivados aromáticos del ácido pirúvico. La ausencia de una secuencia codificante para un péptido señal en el N-terminal y del tripéptido C-terminal para localización glicosomal, es una fuerte evidencia adicional a favor de su ubicación citosólica.

BBM200. Clonado y caracterización de una proteína de la familia SR, *tcsr*, y de una putativa proteína quinasa de proteínas SR, SRPK, en *Trypanosoma cruzi*. PORTAL D, ESPINOZA J, LOBO G, PEREIRA C, ALONSO G, TORRES HN, FLAWIÁ MM.

INGEBI-CONICET. Buenos Aires, Argentina. mflawia@dna.uba.ar

En tripanosomátidos, los ARN mensajeros maduran mediante un mecanismo conocido como trans-splicing. La maquinaria responsable de este proceso es pobremente conocida. En nuestro laboratorio logramos clonar el primer miembro de la familia SR, descrito en el parásito. Del análisis de la secuencia nucleotídica del gen, denominado *tcsr*, se desprende que, éste presenta dos dominios de unión a ARN (RRM1 y 2), así como la existencia de un dominio RS, característico de la familia, hacia el C-terminal. En el genoma del parásito se detectó, mediante ensayos de Southern Blot, la presencia de sólo una copia de este gen. Estas proteínas, en mamíferos, están involucradas en el reconocimiento de los sitios aceptores del splicing y su función está modulada por fosforilación/defosforilación del dominio RS, por parte de una quinasa específica, denominada SRPK. La migración de las proteínas SR hacia los sitios de splicing, se da cuando las serinas del dominio RS, son fosforiladas, por la quinasa antes mencionada. Aquí también se presenta el clonado de una putativa quinasa de proteínas SR, llamado *tsrpk*, de elevada homología con la de organismos superiores. Al igual que el *tcsr*, el gen *tsrpk*, se encuentra como copia única en el genoma, como lo confirman los ensayos de Southern Blot.

BBM201. Transformación de *Trypanosoma cruzi* con el gen de ODC de *C. fasciculata*. Expresión y caracterización de la actividad foránea. CARRILLO C, CEJAS S, GONZALEZ NS y ALGRANATI ID.

Instituto de Investigaciones Bioquímicas – Fundación Campomar, FCEyN, UBA, Cap. Fed., Argentina. : ccarri@iib.uba.ar.

Las poliaminas, putrescina, espermidina y espermina, presentes en todos los organismos vivos, cumplen un rol esencial en síntesis de macromoléculas, proliferación y diferenciación celular. Su biosíntesis comienza por la conversión de ornitina en putrescina, por acción de la "ornitina decarboxilasa" (ODC). *Trypanosoma cruzi*, presenta una marcada dependencia de poliaminas para su proliferación. Sin embargo no sintetiza las poliaminas, sino que las transporta constitutivamente desde el medio externo. Habiendo comprobado que la falta de actividad de ODC se debe a la ausencia del gen correspondiente en el genoma de *T. cruzi*, epimastigotes de cultivo fueron transfectados con un plásmido recombinante que contiene la región codificante completa del gen de ODC de *Crithidia fasciculata*. *T. cruzi* transfectado presentó un alto nivel de expresión del gen exógeno, tanto en forma transiente como estable. Concomitantemente, desarrolló autotrofia para poliaminas y se volvió sensible a DFMO, inhibidor específico e irreversible-

ble de la ODC. La actividad específica de la enzima no presentó inhibición por incubación de los cultivos con putrescina o espermidina. La actividad enzimática fluctuó continuamente a lo largo del tiempo del cultivo, sugiriendo la posibilidad de una integración parcial del transgen en el genoma de *T. cruzi*.

La ODC foránea presentó parámetros cinéticos y peso molecular similares a la ODC nativa en *C. fasciculata*. Sin embargo, la estabilidad metabólica difirió notablemente: mientras que la enzima expresada en *C. fasciculata* tiene una vida media de 30 minutos, en *T. cruzi* tiene una vida media mayor a 4 hs. Este notable incremento en la estabilidad sugiere una marcada diferencia entre las maquinarias proteolíticas de *T. cruzi* y *C. fasciculata*, y podría estar relacionado con la evolución divergente entre parásitos mono y digenéticos.

BBM202. Evaluación de parámetros relacionados con la expresión en bacterias de una proteína del grupo de las calflaginas de *Trypanosoma cruzi* de potencial interés diagnóstico. CORRADI G, MARCIPAR IS, MARCIPAR AJ, SILBER AS.

INTEBIO, Facultad de Bioqca. y Cs. Biológicas (UNL). Santa Fe, Argentina. gcorradi@fbc.unl.edu.ar

Las proteínas del grupo de las calflaginas de *Trypanosoma cruzi* han sido descritas como relevantes respecto de su utilidad para el diagnóstico de la infección en humanos. En este sentido se consideró de interés el análisis de los parámetros que afectan la expresión de esta molécula. En el presente trabajo se ha evaluado la expresión en *Escherichia coli* de esta proteína clonada en diferentes vectores: pET32, pRSET, pGEX, pMAL y pQE32. Para la construcción en pRSET se evaluó además la incidencia en la expresión de la concentración de los iones Ca^{2+} y Mg^{2+} , la concentración del medio de cultivo, y distintas condiciones de inducción (concentración de IPTG, tiempo y temperatura). Para los vectores pQE32 y pRSET no se observaron altos niveles de expresión, siendo detectable el producto por western blot, pero no por tinción directa de geles de poliácridamida con Coomassie. La adición de Ca^{2+} a una concentración 50 mM mejoró considerablemente la expresión. Sin embargo la expresión no tuvo el rendimiento esperado. La concentración del medio de cultivo, de IPTG, la temperatura y los distintos tiempos de inducción evaluados no tuvieron incidencia observable. Se observó sin embargo que los niveles de expresión aumentaron para las construcciones realizadas en pET32, haciéndose la proteína recombinante detectable por visualización directa por SDS-PAGE mediante tinción con Coomassie. Por otra parte, la expresión en pGEX fue aún más eficiente, pero se observó que la proteína recombinante se obtenía separada de la GST, lo cual dificulta su purificación. Finalmente se ha observado que se puede inducir la expresión de esta proteína como producto de fusión en el vector pMAL con muy alta eficiencia, siendo la proteína recombinante aproximadamente un 35-40% de la proteína total observada en un SDS-PAGE. Estos resultados indicarían que la proteína de interés se expresa con mayor eficiencia en los vectores en los que se produce como un producto de fusión.

BBM203. Expresión de cruzipaina madura activa en el sistema Baculovirus – células de insecto. ALVAREZ V, PARUSSINI F Y CAZZULO JJ.

Instituto de Investigaciones Biotecnológicas, Universidad Nacional de General San Martín, 1650 San Martín, Buenos Aires, Argentina.

La cruzipaina (Cr) es la principal cisteína proteinasa (CP) de *Trypanosoma cruzi*. La Cr madura consta de un dominio catalítico, con alta homología con CPs de la familia de la papaína, y un dominio C-terminal (CT) que caracteriza a las CPs de Tipo I de Trypanosomatidos. Si bien se conoce la estructura 3-D de una forma truncada del dominio catalítico (cruzaína), no hay hasta ahora datos estructurales sobre el CT y la relación entre ambos dominios. Ello se debe en buena medida a que hasta ahora no había sido posible expresar Cr activa conteniendo el CT, pues el mismo es procesado por los sistemas bacterianos, probablemente por la falta de modificaciones post-traduccionales. Hemos expresado Cr en el sistema eucariótico de células de insecto (Sf 21) – baculovirus, que permite, en general, altos niveles de expresión heteróloga con plegamiento y localización correctos. Lisados de células infectadas con el baculovirus recombinante, estudiados por SDS-PAGE seguido de Western blot, mostraron una única banda reconocida por el suero anti-Cr natural, con un Mr similar. Geles de SDS-PAGE con gelatina incorporada indicaron una única banda de actividad, también con movilidad similar a la de la Cr natural. La Cr recombinante fué purificada por cromatografía de quelatos metálicos, y está siendo caracterizada en comparación con la enzima natural. Toda la evidencia obtenida sugiere que la Cr recombinante contiene el CT, y puede esperarse, por lo tanto, que sea utilizable para intentar su cristalización y determinación de estructura 3-D.

BBM204. Caracterización molecular de caseína quinasa 1 de *Trypanosoma cruzi*. REPETTO Y, SPADAFORA C*, TORRES C*, PINO L, ROBELLO C**, ESPINOZA I, GALANTI N, MORELLO A, GAMARRO F*, Y CASTANYS S*.

*Programas de Farmacología y de Biología Celular y Molecular, ICBM, Fac. de Medicina, U de Chile *Inst. de Parasitología y Biomedicina «López-Neyra», CSIC, Granada, España. **Dpto de Bioquímica, Fac. de Medicina, U. de la República, Uruguay. amorello@machi.med.uchile.cl*

La proteínaquinasa CK 1 también conocida como caseína quinasa 1, es una enzima con afinidad por residuos de S/T y se encuentra ampliamente distribuida en todas las células eucarióticas. Se han descrito siete isoformas de esta enzima y hay evidencias que indican que algunas de ellas estarían participando en fenómenos de regulación del ciclo celular y de reparación del DNA.

En *T. cruzi* hemos obtenido dos isoformas de esta proteínaquinasa: la CK 1.1 y la CK 1.2; sus cDNA codifican proteínas de 312 y 330 residuos de aminoácidos con un tamaño de 36 y 37 kDa, respectivamente. Ambas quinasas presentan gran homología con otras CK 1. Se ha inducido la expresión en *E. coli* de la CK 1.1 de *T. cruzi*. La proteína recombinante presentó las características de las CK 1 como son la inhibición con CK 1-7 N-(2-aminoetil-5-cloroisoquinolina-8-sulfonamida) y hymenialdisine y la baja inhibición con heparina. Las Km aparentes para los distintos sustratos fueron del mismo orden de magnitud que lo informado para otras quinasas. Los análisis por northern blot y de actividad enzimática indicaron que esta proteína se expresa en las distintas formas del parásito siendo la forma tripomastigota la de menor actividad. Al medir la actividad de esta enzima durante la curva de crecimiento del parásito se observó un aumento progresivo durante la fase exponencial. En cultivos de parásitos sincronizados con hidroxiurea se

observaron dos máximos de actividad, uno durante la fase S y el otro en la fase final de la mitosis.

Financiado en parte por CSIC-Universidad de Chile, SIDA-SAREC y DID U. de Chile.

BBM205. Identificación, caracterización y modelado molecular de una nueva glutaredoxina del *Trypanosoma cruzi*. GARCIA GA, BUA J, ASLUND L, PAULINO M, BONTEMPI EJ y RUIZ AM.

Instituto Nacional de Parasitología "Dr. Mario Fatala Chabén". ANLIS/Malbrán. Buenos Aires. Argentina. gaandgarcia@yahoo.com

El descubrimiento de nuevas moléculas del *Trypanosoma cruzi* que participen en el ciclo del glutatión y la tripanotona, un punto de divergencia entre el metabolismo del hospedero mamífero y el parásito, podrán definir nuevos blancos terapéuticos para esta enfermedad. Con este objetivo se seleccionó el ADNc 19h22 generado a partir del Proyecto Genoma de *T. cruzi*, por poseer su mayor homología con una probable glutatión-S-transferasa (GST) de *Caenorhabditis elegans*, una enzima involucrada en esta vía y aún no clonada en el *T. cruzi*. La secuencia genómica obtenida por hibridación de una genoteca de *T. cruzi* construida en cósmidos con el clon 19h22, mostró un marco abierto de lectura de 936 pb codificando para una proteína de 312 aminoácidos con un peso molecular estimado de 35.17 kDa. Dicha proteína presentó homología con glutaredoxinas (Grxs) y GSTs de diferentes organismos, no encontrándose contraparte en los mamíferos. Dado que contiene el patrón completo de Grx con un sitio activo CPFC esta proteína fue denominada TcGRX. Experimentos de "southern" y "dot blot" sugirieron que este gen se encuentra en copia única. El clon 19h22 hibridó dos cromosomas posiblemente homólogos de 680 y 775 Kpb en electroforesis en campo pulsado (Pulsed Field Gel Electrophoresis). Se realizó el modelado molecular de una porción de la TcGRX utilizando la Grx3 de *E. coli* como templado, demostrándose una estructura terciaria típica de la familia tioredoxina/glutaredoxina. De acuerdo con la secuencia y el modelo estructural obtenido, la TcGRX podría estar implicada en el metabolismo del glutatión/tripantona en el *T. cruzi*. La expresión de la misma y su caracterización bioquímica definirán en qué vía metabólica está involucrada y nos dará información para ser seleccionada como blanco para el desarrollo de drogas tripanocidas.

Este proyecto recibió apoyo de ANLIS/Malbrán.

BBM206. Caracterización del locus SZ5 de *Trypanosoma cruzi*. LORENZI H, VAZQUEZ M, LEVIN MJ.

INGEBI (CONICET-FCEyN, UBA). Buenos Aires, Argentina. hlorenzi@dna.uba.ar

SIRE es un elemento repetido de 428pb del genoma nuclear de *Trypanosoma cruzi*. Para estudiar su distribución se secuenciaron parcialmente 16 clones que contenían SIRE a partir de una biblioteca genómica construida en el vector de clonado λ ZAP II. Entre éstos, un clon de 3906pb denominado SZ5, contenía 300pb del elemento SIRE en su extremo 3' y un marco de lectura abierto (ORF) con un codón stop en la posición 1409 en su extremo 5' (gen TcRH1). La traducción de dicho ORF presentaba 34% de identidad con la familia de proteínas ARN helicasas DEAH-box que no habían sido descritas hasta el momento en tripanosomatidos, por lo que decidimos caracterizar completamente el locus

SZ5. Ensayos de Southern blots indicaron que dicho *locus* se encontraba en única copia en la cepa CL-Brener. También determinamos por Cromoblot que el *locus* SZ5 se encontraba en las bandas cromosomales III y VII. Por RT-PCR obtuvimos la secuencia completa del gen *TcRH1*, y determinamos que el mismo codifica para una proteína de 901aa con una masa estimada de 100.4kDa. Su región central (desde el aminoácido 192 al 567) contiene los 7 dominios conservados de la familia de proteínas DEAH-box de helicasas de ARN. Esta región comparte 46% de identidad con la proteína PRP22 de *Saccharomyces cerevisiae*, que cual participa en la liberación del ARNm maduro del spliceosoma. La secuencia del fragmento SZ5 permitió identificar dos nuevos genes localizados río abajo del gen *TcRH1*. El primero, *TcNU1*, codifica para una proteína de 261aa con una masa estimada de 29.7kDa. La misma posee en su región C-terminal un dominio de 67aa que presenta 45% de identidad con el dominio C-terminal de la familia de proteínas NifU, que participan en la formación de grupos Fe-S. El tercer gen, *TcEIF6*, codifica para una proteína de 248aa y 26,8kDa que presenta 61% de identidad con el factor de inicio de la traducción eIF-6 de *Schizosaccharomyces pombe*. Análisis de Northern blots permitieron determinar que tanto el gen *TcRH1* como el gen *TcEIF6* se expresan en el estadio epimastigote de *T. cruzi* mientras que el gen *TcNU1* no.

BBM207. Estudios de mutagénesis dirigida y modelado molecular de la deshidrogenasa de L- α -hidroxiácidos aromáticos (AHADH) de epimastigotes de *Trypanosoma cruzi*. VERNAL J¹, FISER A⁴, SALI M⁴, MÜLLER M³, CAZZULO JJ² Y NOWICKI C.¹

¹Fac. de Farmacia y Bioquímica, UBA, ²Instituto de Investigaciones Biotecnológicas, Universidad Nacional de Gral. San Martín, Buenos Aires, Argentina. ³Biochemical Parasitology Laboratory, ⁴Molecular Modeling Department, Rockefeller University, New York, USA. cnowicki@criba.edu.ar

La AHADH de *T. cruzi* reduce los derivados aromáticos del ácido pirúvico a los correspondientes derivados del ácido láctico en una reacción acoplada a la oxidación de NADH. Puede reducir también, aunque con menor eficiencia, el 2-oxoisocaproato. Del alineamiento de la secuencia de la AHADH con las existentes en las bases de datos surge un 50-53 % de identidad con malato deshidrogenasas (MDHs) citosólicas; conservándose todos los residuos esenciales en las MDHs, con excepción de la R102, sustituida por alanina en la AHADH. La mutación R102A podría ser la responsable de que la AHADH no pueda reducir al oxalacetato ya que el residuo 102 se conoce como el determinante de la especificidad de sustrato en la familia de las deshidrogenasas de L- α -hidroxiácidos. Para confirmar que la similitud de la AHADH con las MDHs se refleja también en su aspecto funcional, se diseñaron las mutantes A102R, H195A y R171K. La primera de ellas permitió que la AHADH adquiriera capacidad de reducir oxalacetato sin perder su especificidad original. En cambio las mutantes H195A y R171K resultaron inactivas indicando que al igual que en las MDHs, la H168 participaría en el mecanismo de catálisis y la R171 en la interacción con el carboxilato del sustrato. Por otra parte, se construyó un modelo para la enzima del parásito utilizando las coordenadas depositadas en el banco de datos para las MDH citosólica de cerdo y la MDH de *E.coli*. En base al modelo teórico y con el fin de obtener evidencias experimentales sobre los residuos del sitio activo determinantes de la especificidad de la AHADH se diseñaron las

siguientes mutantes: Y237G, I239V, Y239G/I239V, A102R/Y237G A102R/I239V y A102R/Y237G/I239V. El análisis de las constantes cinéticas para los distintos sustratos mostró que la Y237 participa en la correcta ubicación del fenilpiruvato en el sitio activo, con una menor relevancia en la unión del p-hidroxifenilpiruvato y 2-oxoisocaproato.

BBM208. Caracterización de la quinasa relacionada a Cdc2p de *Trypanosoma cruzi*, TzCRK3, por medio del método del doble híbrido. LARÍA S, GÓMEZ EB y TÉLLEZ-ÍNÓN MT.

INGEBI-CONICET y FCEyN, UBA. Buenos Aires, Argentina. slaria@fibertel.com.ar.

En organismos eucariotas la transición de las fases del ciclo celular G₁/S y G₂/M está controlada por quinasas dependientes de ciclinas, llamadas CDK (*Cyclin Dependent Kinases*). En tripanosomátidos, mediante el empleo de técnicas de biología molecular, se han identificado genes relacionados a la quinasa Cdc2p llamados CRKs (Cdc2p-related kinases). Sin embargo, el papel de estas proteínas en el control del ciclo celular no se ha establecido. En nuestro laboratorio se han clonado y caracterizado parcialmente dos quinasas de proteínas relacionadas con la Cdc2p, TzCRK1 y TzCRK3, en *T. cruzi*. Utilizando a CRK1 como proteína señuelo en la técnica del doble híbrido se aislaron las ciclinas de *T. cruzi* TzCYC4, TzCYC5 y TzCYC6. Se estudió, en primer lugar, la capacidad de CRK3 de asociarse con las ciclinas aisladas previamente para CRK1. Solo dos de las tres ciclinas, CYC4 y CYC5, fueron capaces de interactuar con CRK3. Con el objetivo de encontrar ciclinas u otras potenciales proteínas regulatorias de esta quinasa se utilizó la técnica del doble híbrido empleando una biblioteca de ADN copia de epimastigotes de *T. cruzi* y a la proteína CRK3 como señuelo, en levaduras de la cepa L40. Esta cepa tiene dos genes *reporter*, HIS3 y LacZ, que permiten detectar interacciones entre proteínas a través de la capacidad de estas levaduras de crecer en medio sin histidina y dar positivo el ensayo de actividad de β -galactosidasa. El análisis de los clones positivos permitió la identificación de dos marcos abiertos de lectura. Comparaciones con bases de datos mostraron homología entre la secuencia aminoacídica deducida de uno de los clones y una proteína llamada radixina, miembro de la familia de las ERM. Estas proteínas, en vertebrados, están involucradas en la organización del citoesqueleto y en la asociación entre filamentos de actina y proteínas de membrana.

BBM209. Sobre-expresión y supresión funcional de la arginina kinasa de *Trypanosoma cruzi*. PEREIRA CA, ALONSO GD, IVALDI MS, COCHELLA L, PAVETO C, FLAWIÁ MM y TORRES HN.

Instituto de Investigaciones en Ingeniería Genética y Biología Molecular, Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas y Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina. cpereira@proteus.dna.uba.ar

La arginina kinasa cataliza la síntesis de fosfoarginina a partir de arginina y adenosin trifosfato (ATP), este fosfógeno actúa como un reservorio intracelular de energía permitiendo la rápida recuperación de los niveles normales de ATP. En nuestro laboratorio se ha caracterizado bioquímica y molecularmente la enzima arginina kinasa de *Trypanosoma cruzi*. Dado que esta enzima es diferencial entre el parásito y el hospedador mamífero, el objetivo de este trabajo es

determinar si es esencial para la viabilidad del parásito constituyéndose de esta manera en un posible blanco terapéutico. Con el objetivo de evaluar la funcionalidad de la arginina kinasa en el metabolismo del *T. cruzi* se obtuvieron transfectantes estables a partir de epimastigotes de la cepa CL Brener, en los cuales la arginina kinasa fue sobre-expresada o parcialmente anulada. Para ello se utilizó un vector de expresión específico de *T. cruzi* (pTREX) en el cuál se subclonó el gen de la arginina kinasa en orientación sentido y antisentido. La sobre-expresión y supresión funcional de la arginina kinasa se analizaron por medio de ensayos de actividad enzimática, los niveles de mRNA a través de ensayos de Northern blot, y las variaciones en la expresión mediante Western blots. Una vez validado el modelo, se analizará como las fluctuaciones en los niveles de arginina kinasa afectan aquellos procesos de mayor demanda energética: el tiempo de duplicación y la cinética de crecimiento. Además podrá usarse este modelo para investigar el rol de esta enzima en otros procesos importantes en el ciclo de vida del parásito como la diferenciación, invasión y motilidad celular.

BBM210. Influencia de un elemento repetido en la regulación de la expresión de ARNm de *Trypanosoma cruzi*. BEN-DOV C, VAZQUEZ M, LEVIN M.

INGEBI (CONICET-FCEyN, U.B.A.). Buenos Aires, Argentina. *cbendov@dna.uba.ar*.

El elemento SIRE (Short Interspersed Repetitive Element) de 428 pb, fue descrito por primera vez al comparar las secuencias de los *loci* genómicos correspondientes a la proteína ribosomal TcP2 β de *T. cruzi*. SIRE, al insertarse en la región intergénica que precede a TcP2 β interrumpe el tracto de pirimidinas correspondiente a la señal de *trans-splicing* (TS) pero aporta una nueva señal que disminuye en un 40% la eficiencia en el TS. Existen 1500-3000 copias en el genoma nuclear de *T. cruzi*, dependiendo de la cepa, distribuidas en todos los cromosomas. SIRE está en casi el 2% de los ARNm correspondientes a los estadios epi- y tripomastigote del ciclo de vida del parásito. Algunos fueron secuenciados e indican que SIRE puede estar tanto en la región 5' como en la 3' UTR, siendo dador del sitio de poly(A) en el 63% de los ARNm analizados. En consecuencia decidimos estudiar si la presencia de SIRE en las regiones 3' UTR tiene alguna implicancia funcional en los niveles finales de expresión de un ARNm. Utilizando al gen CAT como reportero generamos 2 tipos de construcciones para analizar la influencia de SIRE en la región 3'UTR. A) Un vector que utiliza en 5' una señal fuerte de TS, la región intergénica (RI) HX1, y como RI 3' de CAT a SIRE seguido de la RI del gen de *gapdh*, o la RI de *gapdh* solamente y B) Un vector que utiliza como región de TS la señal crítica del promotor ribosomal, y mantiene las estructuras en 3' de las construcciones mencionadas en A. Con estos 4 vectores se transfectaron epimastigotes y una vez que se obtuvieron las líneas estables, se realizaron los ensayos de actividad CAT. Observamos que cuando se utiliza las construcciones del tipo A la presencia de SIRE en la región 3' disminuye un 40% la actividad CAT respecto de *gapdh*, y que esta disminución alcanza un 70% al utilizar las construcciones del tipo B. En conclusión, SIRE disminuye los niveles finales de un ARNm cuando se compara con la eficiencia de una región constitutiva como la de *gapdh*, y este efecto se ve acentuado en presencia de una señal de TS débil.

BBM211. Influencia de una delección dirigida del gen cub sobre la virulencia de la cepa Tulahuén del *T. cruzi*. BARRIO, A¹; VAN VOORHIS, W; MORA, M¹; SOLER, G; RAMOS, F Y BASOMBRIÓ, MA¹.

¹Lab. de Patol. Exp. UNSa. ²Infectious Dis. Lab, U. of Washington, USA. *barrioa@unsa.edu.ar*.

En el presente trabajo se verificó si existen cambios en la virulencia de la cepa Tulahuén (altamente infectiva) del *T. cruzi*, al producir el knock-out mediante transfección de uno de los alelos del gen CUB (relacionado con la virulencia del parásito). Epimastigotes de la cepa Tulahuén fueron electroporados con un fragmento lineal de 2,3 Kb conteniendo el gen marcador NEO, obtenido a partir de la digestión del plásmido: PBS-IL-2-CnFc (La Flamme *et al.* 1996) con las enzimas *BamH 1* y *Afl2*, de tal manera de reemplazar por transfección el gen CUB por el gen NEO. Los parásitos fueron seleccionados de acuerdo a su resistencia al antibiótico G418 y clonados en ausencia de antibiótico. Mediante Southern Blot se comprobó la delección de una de las copias del gen CUB. Un clon de parásitos transfectados (Clon 8) y los no transfectados (WT) se inocularon en ratones Swiss adultos (RSA) o BALB recién nacidos (RBRN), inyectando por vía intraperitoneal 10³ ó 10⁶ trypomastigotes resistentes al complemento (TRC). Los resultados obtenidos mediante gota fresca (GF) en el día pico de parasitemia (x parásitos/100 campos \pm ES) fueron los siguientes:

Inóculo y Ratones	WT	Clon	p
10 ³ TRC en RSA	16.5 \pm 1.7 n=5	0 \pm 0 n=5	P= 0,0057
10 ⁶ TRC en RSA	27.3 \pm 2.6 n=6	0.4 \pm 0.09 n=7	P= 0,018
10 ³ TRC en RBRN	82.7 \pm 18.9 n=7	6 \pm 0.6 n=5	P= 0,035
10 ⁶ TRC en RBRN	6512 \pm 1478 n=6	237 \pm 125.77 n=12	P= 0,002

En varios animales inoculados con Clon 8, con GF (-), el microstrout o hemocultivo reveló resultados (+), sin que el pasaje in vivo eliminara el gen de resistencia al antibiótico. Estos datos indican un cambio en la capacidad infectiva de la cepa virulenta Tulahuén del *T. cruzi*, causada por el knock-out de uno de los alelos del gen CUB. Si bien la atenuación observada no es total, este ensayo nos sugiere que se puede obtener una cepa atenuada de *Trypanosoma cruzi* mediante la acumulación sucesiva de mutaciones génicas dirigidas. Financiado por CIUNSA.

BBM212. Clonado y Caracterización de la enzima Ferredoxina-NADP⁺ reductasa de *Schistosoma mansoni* (SmFNR). GIRARDINI JE*, DISSOUS C[§] y SERRA EC*.

*Instituto de Biología Molecular y Celular de Rosario (IBR). Universidad Nacional de Rosario. Argentina. [§]Instituto Pasteur de Lille. Francia. *gjrardi@fbioyf.unr.edu.ar*.

Schistosoma mansoni es un parásito humano del tipo Plathelminthos, el cual representa la segunda endemia a nivel mundial, después del paludismo. Durante el proceso de infección del huésped mamífero el parásito es sometido a una situación de stress químico, generado por los mecanismos

efectores del sistema inmune, en particular debido a la liberación de especies reactivas del oxígeno. Enzimas del tipo Ferredoxina-NADP⁺ reductasa (FNR), capaces de catalizar la reducción de sustratos a partir de NADPH, han sido implicadas con la tolerancia a stress oxidativo. Mediante una estrategia de PCR nested se generó una sonda específica para SmFNR, amplificando ADNc de *S. mansoni* adulto. Dicha sonda fue utilizada para el rastreo de una biblioteca de ADNc de *S. mansoni* adulto. De esta manera se identificó un fragmento de 2 kb cuya secuencia indicó la presencia de un marco de lectura abierto. La secuencia de aminoácidos deducida presentó un porcentaje de identidad con las secuencias de FNRs de tipo mitocondrial de aproximadamente 40%. El análisis por southern blot demostró que la secuencia obtenida es específica de *S. mansoni*. Mediante experimentos de northern blot y de RT-PCR se determinó la presencia del ARNm de Sm FNR en distintos estadios del parásito. Se analizó la presencia de actividad diaforasa en extractos del parásito mediante geles de actividad. Estos estudios indicaron la presencia de actividad en distintos estadios del parásito. El fragmento fue subclonado para generar un vector de expresión el cual fue utilizado para expresar la enzima recombinante en *Escherichia coli*. El análisis de los extractos de *E. coli* indicó la presencia de actividad diaforasa relacionada con la enzima recombinante. Se generaron anticuerpos policlonales contra SmFNR. El análisis de extractos de *S. mansoni* con estos anticuerpos identificó la presencia de proteínas del tamaño esperado en los estadios de cercaria y adulto.

BBM213. Clonado y expresión de la malato dehidrogenasa mitocondrial (mMDH) del helminto parásito *Echinococcus granulosus*. NOE, G.¹, AGÜERO, F.¹, ZAHA, A.² y CAZZULO, J.J.¹

¹Instituto de Investigaciones Biotecnológicas - Instituto Tecnológico de Chascomús, Universidad Nacional de General San Martín - CONICET, San Martín, Provincia de Buenos Aires, Argentina. ²Centro de Biotecnología, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil. fernan@iib.unsam.edu.ar

La malato dehidrogenasa mitocondrial funciona en helmintos parásitos como parte del ciclo de Krebs, tanto en la producción aeróbica de energía, como en la fermentación mitocondrial característica de estos organismos (dismutación del malato). A partir de la enzima purificada a homogeneidad obtuvimos información de secuencia de 3 péptidos tripticos. Esta información fue utilizada para diseñar oligonucleótidos degenerados que permitieron amplificar dos fragmentos correspondientes a la región central del cDNA.. A su vez, estos fragmentos fueron utilizados como sonda para rastrear una biblioteca de cDNA de protoescólices de *E. granulosus*. Como resultado del rastreo se obtuvo un clon incompleto conteniendo toda la región central del cDNA y el extremo 3' del mismo. La información de secuencia del extremo 5' del cDNA se obtuvo mediante la técnica de amplificación rápida de extremos de cDNA (RACE). Finalmente, el cDNA completo fue amplificado a partir de RNA total de protoescólices utilizando oligonucleótidos conteniendo adaptadores para el posterior clonado en el vector de expresión (pGEX). La mMDH fue expresada en forma de fusión con la GST provista por el vector, en células *E. coli* DH5a.

BBM214. Plasticidad genómica en el cestode *Echinococcus granulosus*. KAMENETZKY L, CANOVA S, HAAG K*, SANTOS C*, GUARNERA E, ROSENZVIT, M.ç

Instituto Nacional de Parasitología. ANLIS "Dr. Carlos G. Malbrán". Buenos Aires, Argentina; *UFRGS, Porto Alegre, Brasil. marar@anlis.gov.ar

Con el objetivo de caracterizar las cepas de *Echinococcus granulosus* presentes en nuestro país y países limítrofes se analizaron 73 aislamientos provenientes de diferentes huéspedes intermediarios y del huésped definitivo, mediante secuenciación de un gen mitocondrial (CO1). Las cepas encontradas fueron: oveja (G1), oveja de Tasmania (G2), vaca (G5), camello (G6), por primera vez descripta como infectiva para el hombre, y cerdo (G7). Dentro de la cepa G1 se observaron 4 grupos, 3 que difieren cada uno en una base y uno idéntico a la cepa patrón. Se continuaron los estudios con muestras representativas de cada cepa, utilizando 3 secuencias genómicas diferentes. Se realizaron Southern blots utilizando como sonda un elemento repetido no transcrito (TREG). En las cepas G6 y G7 se encontró un alto número de copias (23000) y un patrón en escalera mientras que las cepas G1 y G2 tienen 190 veces menos copias y una distribución dispersa más variable. Se clonaron y secuenciaron los monómeros de TREG y se observó que en la cepa G7 esta unidad se encuentra conservada mientras que en la cepa G1 las copias difieren en un 20%. Southern blots con la sonda de un gen de copia única, homeobox 3 (EgHbx3), revelaron distintos patrones inter e intra cepa siendo la cepa G1 la más polimórfica. Al realizar estudios de SSCP de la región 5' no codificante del gen de la malato dehidrogenasa citosólica, la cepa G1 mostró el mayor número de patrones, la mayoría heterocigotas, mientras que en la cepa G6 se encontró un único patrón homocigota. Los resultados obtenidos muestran que hay por lo menos 5 cepas, 3 de las cuales infectan al hombre, siendo la cepa G1 la de mayor variabilidad interna y mayor rango de huéspedes. La plasticidad genómica encontrada muestra la capacidad de *E. granulosus* de generar variantes capaces de adaptarse a cada huésped, que implicarían diferencias en el diagnóstico, la respuesta a drogas y a eventuales vacunas contra la hidatidosis.

EP215. Relevamiento y seguimiento de anticuerpos contra *Toxoplasma gondii* en una población de mujeres embarazadas de la provincia de Mendoza. LO CASTRO I, GARCIA N, RAMOS E, VIA G.

Sección de serología, Hospital Central de Mendoza. ivlocastro@yahoo.com.ar

El control de infecciones como la toxoplasmosis en la mujer embarazada es relevante ante las consecuencias que la misma puede alcanzar en el recién nacido, y en vista de la existencia de adecuadas conductas terapéuticas. Se evaluó el status inmune de una población de 104 mujeres embarazadas sin antecedentes de toxoplasmosis. En 23 de las mismas (22 %) pudo realizarse eficientemente su seguimiento serológico hasta la semana 15^o de gestación. La metodología de estudio consistió en la obtención de dos muestras serológicas en diferentes tiempos de su gesta, que fueron analizadas por hemaglutinación indirecta (HAI), inmunofluorescencia indirecta (IFI) y ELISA, con identificación de isotipo responsable. Objetivo: Nuestro interés fue determinar la seroprevalencia de anticuerpos contra *Toxoplasma gondii* en un grupo de mujeres en edad fértil de nuestra comunidad, y su seguimiento hasta la semana 15^o de gestación, con el fin de pesquisar posible primoinfección, y dar oportunidad a una adecuada conducta terapéutica. Resultados. de 104 pacientes estudiadas, 23 (22 %) resultaron tener

serología positiva (IgG) por IFI y 25 (24 %) por HAI positivas. Solo una de las pacientes resultó IgM reactiva en su primera muestra. De las 23 pacientes que concurren al segundo llamado, solo aquella que evidenció reactividad para IgM en la primera muestra continuó siéndolo en la segunda. Quien además triplicó su título en HAI e IFI. Conclusión: La baja seroprevalencia hallada es un importante indicador del riesgo de infección y revela la importancia que tiene el adecuado seguimiento de laboratorio y su posible tratamiento en la mujer embarazada.

EP216. Estudio descriptivo de toxoplasmosis, prevalencia serológica en una población hospitalaria. VIA G, RAMOS E, GARCÍA N, LO CASTRO I.

Lab. de Serología del Dpto. de Bioquímica Clínica del Hospital Central de Mendoza. via@supernet.com.ar

Introducción: la toxoplasmosis es una zoonosis ampliamente distribuida. Es producida por el *Toxoplasma gondii*, un protozoo perteneciente al Phylum Apicomplexa. La infección humana puede producirse por *bradizoítos* (ingestión de carnes mal cocidas), *taquizoítos* en un pseudoquiste al comer vísceras o huevos semicocidos, *ooquiste esporulado* (vehiculizados por verduras contaminadas con heces de gatos infectados), *trofozoítos* (transmisión transplacentaria). Una vez ingerido el elemento infectante

llega al intestino y se disemina por vía linfática o sanguínea llegando a distintos órganos donde forman quistes tisulares (SN, ojo, músculo, miocardio, vísceras en general). Éstos permanecen para siempre en los tejidos. Se ha observado que en pacientes inmunosuprimidos (HIV) se pueden presentar cuadros de reagudización de la enfermedad. La transmisión transplacentaria ocurre sólo durante la primoinfección, aunque algunos autores sospechan de otros mecanismos.

Objetivos: determinar la prevalencia en la población. Definir grados de la respuesta inmune, basados en los títulos más frecuentes de anticuerpos. Evidenciar hallazgos de infección toxoplásmica pasadas o presentes en embarazadas y pacientes con HIV.

Materiales y métodos: se estudiaron 3800 muestras de pacientes que llegaron a nuestro laboratorio con algún signo sugestivo de toxoplasmosis entre el 1 de abril de 1994 y 1 de abril de 2000. Entre las muestras remitidas se encontraban pacientes HIV y embarazadas. A las mismas se les realizaron pruebas de HAI (**Wiener**), IFI y MEIA, considerándose para el estudio sólo las muestras en las cuales coincidían los resultados.

Conclusiones: la prevalencia serológica fue de un 36.5% para el total de los sueros analizados. Un 13,6% de las muestras estudiadas correspondieron a embarazadas, de las cuales el 54,9% presentó serología positiva. Se observó que el título más frecuente fue de 1/128.

LA PORTADA

Raúl Veroni. **El niño y su mano**, 1939

Grabado, 50 x 25 cm. Cortesía de la Comisión Nacional de Energía Atómica, Predio TANDAR, Centro Atómico Constituyentes. Presidente de la Comisión Organizadora de la Exposición Permanente: Dr. A. J. G. Maroto.

Raúl Veroni, grabador y dibujante, nació en Milán en 1913 y vivió desde muy temprana edad en la Argentina, hasta su muerte, en 1992. Obtuvo numerosos premios, entre los que se destacan: el Primer Premio Salón Acuarelistas, Grabadores y Pintores, en los años 1936, 37, 38 y 39 y el Premio Adquisición Salón de Santa Fe, en 1941. Ilustró ediciones de bibliófilos sobre obras de Poe, Kafka y Lugones, entre otros. Por ello el Pen Club le tributó en 1974 un homenaje. En América y en Europa hay obras suyas en museos y colecciones privadas¹.

¹ *Extractado de:* Comisión Nacional de Energía Atómica. Artistas Plásticos con la CIENCIA, 101 Centro Atómico Constituyentes, Predio TANDAR, Buenos Aires, 1999. Pág. 114.