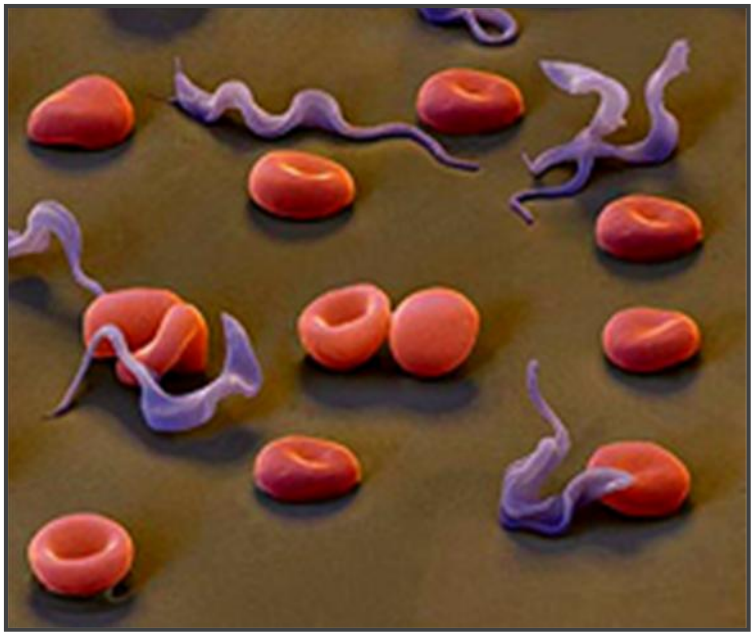
2014-2015

Firmado digitalmente por Jose M. Requena
Nombre de reconocimiento (DN): cn=Jose M. Requena, o=Universidad Autonoma de Madrid, ou=Departamento de Biologia Molecular, email=jm.requena@uam.es, c=ES
Fecha: 2015.03.20 16:11:32 +01'00'

Daniel Fernández Soto
Jesús Gómez Alonso
Alejandro Hortal Borowski
Lucía Jiménez Gómez
Zahira Razola López

TRYPANOSOMA CRUZI



FACULTAD DE CIENCIAS

Microbiología clínica

Grado en Bioquímica

Departamento de Biología Molecular

UAM UNIVERSIDAD AUTONOMA DE MADRID

U. A. M. © 2014

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN 3

2. CICLO DE VIDA 5

3. PATOLOGÍA Y DIAGNÓSTICO DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS 8

3.1 PATOLOGÍA 8

3.2 TRATAMIENTO 12

3.3 DIAGNÓSTICO 13

4. INVASIÓN DE CÉLULAS FAGOCÍTICAS Y NO FAGOCÍTICAS 19

4.1. MECANISMO DE INVASIÓN DE CÉLULAS 19

4.2. MOLÉCULAS DE LA SUPERFICIE DEL PARÁSITO IMPLICADAS EN LA INVASIÓN 24

4.2.1. Antígenos de superficie de tripomastigotes 24

4.2.2. Trans-sialidasas y papel de las moléculas aceptoras de ácido siálico en la invasión 25

4.2.3. El papel de las peptidasas 25

4.3. MOLÉCULAS DE SUPERFICIE DE LA CÉLULA HOSPEDADORA 26

4.4. ESCAPE DE LA VACUOLA PARASITÓFORA 27

5. REFERENCIAS 29

1. INTRODUCCIÓN

Trypanosoma cruzi tiene la característica de ser uno de los pocos patógenos que fue descubierto y estudiado antes de saberse que era el agente causal de una enfermedad. En 1908, mientras Carlos Chagas examinaba la sangre de un mono tití (*Callithrix penicillata*), identificó un protozoario del género *Trypanosoma* que llamó *Trypanosoma minasense*. Además de la investigación de parásitos, Chagas estaba interesado en los insectos que podrían actuar como vectores para ellos. Oyó hablar de un insecto hematófago que proliferaba en las chozas de bahareque en una región de Brasil. Era conocido popularmente como 'barbeiro', ya que tendía a picar en los rostros de la gente mientras dormía. Consciente de la importancia de los mosquitos como transmisores de enfermedades parasitarias, Chagas examinó algunos insectos y encontró formas flageladas del protozoo en sus intestinos, que podrían ser un parásito natural del insecto o de lo contrario un tripanosoma en los vertebrados. En este caso, incluso podría ser una etapa evolutiva de *T. minasense*. Posteriormente, Chagas descubrió que el protozoario no era *T. minasense*, parásito identificado en los titís, sino que se trataba de una nueva especie, que denominó *Trypanosoma cruzi*, en honor a su "maestro" Oswaldo Cruz.

En 1909, este investigador dio cuenta del primer caso de infección aguda de *T. cruzi* en humanos, al encontrarlo en la sangre de una niña de dos años. No obstante se estima que esta infección viene afectando a la humanidad desde tiempos pretéritos, ya que se ha detectado DNA de *T. cruzi* en momias encontradas en Chile y Perú de hace más de 9000 años.

También se piensa que Charles Darwin probablemente contrajo la infección con *T. cruzi* durante su expedición a Sudamérica en 1835, hecho que se deduce de la descripción tan detallada que hizo de los triatomas (chinche chupadora) y de algunos síntomas que experimentó años más tarde.

El tripanosoma americano *T. cruzi* es el agente causante de la enfermedad de Chagas en el hombre, una enfermedad que es un importante problema de salud en América Central y del Sur. Se estima que 16-18 millones de personas están afectadas por la enfermedad crónica. En los últimos 25 años, como resultado de la aplicación de importantes medidas de control tanto sobre el vector como de las transfusiones sanguíneas, la incidencia de la enfermedad de Chagas ha disminuido desde unos 700.000 casos anuales por año hasta unos 40.000 que se producen actualmente. Asimismo, el número de muertes ha descendido desde unas 45.000 hasta 12.500. Sin embargo, el control de la enfermedad no ha sido igualmente eficaz en todos los países, y en países como Bolivia la incidencia sigue siendo muy grande.

En la figura 1 se muestra un mapa de distribución geográfica de la enfermedad. Aunque la transmisión del insecto está siendo eficientemente controlada en muchas de las áreas desarrolladas, las transfusiones de sangre y las infecciones congénitas siguen siendo importantes fuentes de enfermedad. El análisis de los bancos de sangre frente a la infección por *T. cruzi* es realizado de forma habitual en muchos países de Latinoamérica (salvo en Bolivia), pero no así en otros países donde la infección no es endémica, aunque esto está cambiando. Este hecho puede ser importante a considerar en países con una importante inmigración de latinoamericanos.

En la figura 2 se muestran las estimaciones sobre el número de personas infectadas que viven fuera de Latinoamérica. Así se estima que hay unos 300.000 afectados en USA. Estimaciones recientes indican que en España podrían vivir entre 47738-67423 inmigrantes infectados por este parásito.

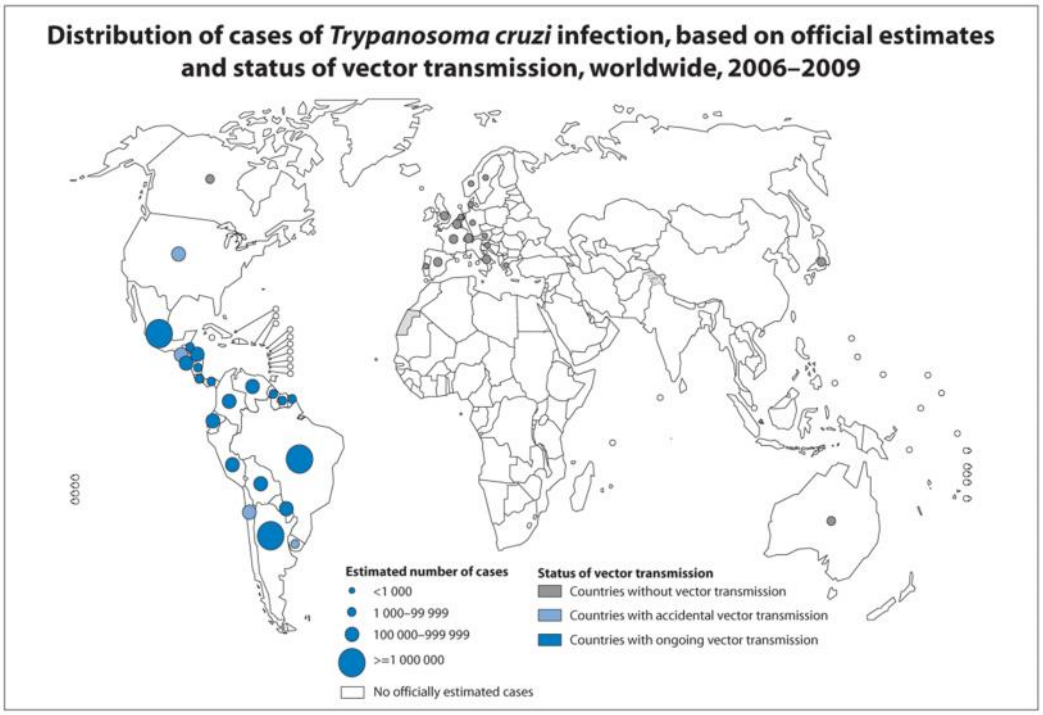


Figura 1. Distribución geográfica de casos de infección por *Trypanosoma cruzi* entre los años 2006 y 2009, basados en estimaciones oficiales y el estado de transmisión del vector. Se estima que cerca de 10 millones de personas en todo el mundo están infectados con *T. cruzi*, en su mayoría en las zonas endémicas de América Latina.
Obtenida de First WHO report on neglected tropical diseases, 2010.
http://gamapserver.who.int/mapLibrary/Files/Maps/Global_chagas_2009.png

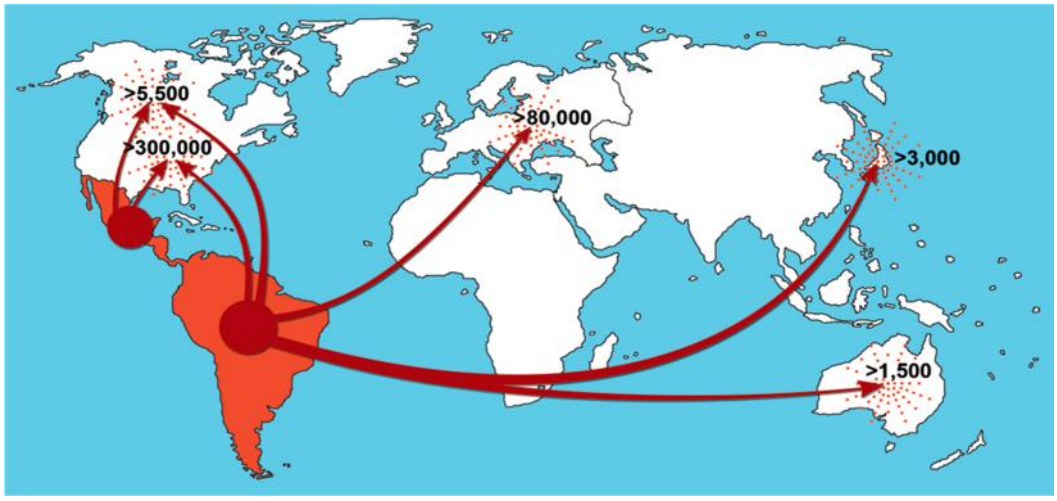


Figura 2. Rutas de migración de *T. cruzi* desde América Latina y estimación del número total de individuos afectados en países no endémicos del parásito.
Obtenida de Rodrigues-Coura et al. (2010)

2. CICLO DE VIDA

T. cruzi es un kinetoplasto, protozoo parásito cuyo ciclo de vida alterna entre hospedadores vertebrados e invertebrados (Fig. 3).

La forma infectiva de *T. cruzi* es el tripomastigote metacíclico. Tiene una longitud de 15 micras y un único flagelo, que se origina en la base del kinetoplasto, una mitocondria que contiene un DNA muy peculiar.

La transmisión de *T. cruzi* entre personas ocurre a través de diferentes medios. La forma más frecuente es a través de triatomas; estos insectos hematófagos son conocidos como "barbeiros" en Brasil, "vinchuca" y "chinche chupadora" en otros países de Latinoamérica. Existen varios géneros que pueden actuar de insectos vector: *Panstrongylus*, *Triatoma* y *Rhodnius*. Las especies consideradas como los principales vectores de la transmisión son: *Triatoma infestans, Rhodnius prolixus* y *Triatoma dimidiata*.

La infección ocurre poco después de que el chinche infectado hace su toma de sangre. Mientras se alimenta, el insecto defeca sobre la piel cerca de la herida de la picadura. Las heces contienen los tripomastigotes infectivos.

Cuando la chinche abandona el sitio, el hospedador experimenta un pequeño picor y frota los tripomastigotes sobre la herida del picotazo. Si la chinche pica en la cara cerca del ojo o la boca, los organismos pueden infectar a través de las mucosas.

Otras vías de adquirir *T. cruzi* incluye las transfusiones sanguíneas, el trasplante de órganos, la infección transplacental y el intercambio sexual. Estudios recientes indican que el parásito podría infectar por la ruta oral al estar presente en alimentos contaminados.

Los tripomastigotes entran en una gran variedad de células en el sitio del picotazo. Tras la entrada, los tripomastigotes se localizan en una vacuola parasitófora de la que escapan poco tiempo después, transformándose en amastigotes que se multiplican en el citosol. El amastigote tiene 3-5 micras de diámetro y no posee flagelo externo.

Después de un tiempo de adaptación de unas 20 horas, los amastigotes intracelulares se replican por fisión binaria con un tiempo de generación de alrededor de 12 h. Se ha estimado que los amastigotes van a experimentar unos nueve ciclos de división, lo que va a generar unos 500 parásitos dentro de la célula infectada; esto ocurre en 5-6 días tras la infección.

Cuando las células están próximas a morir por la gran carga de parásitos, los amastigotes se transforman en tripomastigotes sanguíneos, que dada su movilidad van a provocar la rotura de la membrana plasmática y su liberación al medio extracelular. Los tripomastigotes penetran en nuevas células, se transforman en amastigotes, y comienzan de nuevo el proceso de replicación. Se piensa que cualquier célula nucleada puede ser infectada por el parásito, aunque las células más frecuentemente invadidas son las células del sistema reticuloendotelial del bazo, el hígado y nódulos linfáticos y las células de músculo cardiaco, liso y esquelético. No

obstante, el sistema nervioso, la piel, las gónadas, la mucosa intestinal, la médula ósea y la placenta también son infectadas en muchos casos.

Como resultado de esta diseminación cualquier tejido puede terminar albergando parásitos, incluyendo desde el músculo cardiaco hasta el sistema nervioso.

Los triatomas se infectan cuando ingieren sangre de un individuo que contenga tripomastigotes.

Los tripomastigotes se transforman rápidamente en epimastigotes (formas flageladas que se dividen) dentro del intestino medio de la chinche, donde se generan miles de nuevos epimastigotes. Los epimastigotes se adhieren a las células intestinales. En las partes más posteriores del intestino y en el recto, los epimastigotes se sueltan de la pared intestinal y se transforman en formas altamente infectivas, los tripomastigotes metacíclicos, que son liberados al exterior junto con las heces.

Se piensa que la mayoría de los mamíferos son susceptibles a la infección y pueden servir como reservorios, dado que se ha encontrado el parásito en más de 150 especies de animales, tanto domésticos como silvestres. Por tanto, se trata de una infección muy extendida en la naturaleza. El perezoso, y algunos roedores son importantes para mantener el ciclo selvático. Muchas de las especies de mamíferos que son reservorios para *T. cruzi* son carnívoros y pueden resultar infectados cuando ingieren y mastican vectores infectados con *T. cruzi*, ya que sus mucosas gastrointestinales van a quedar expuestas a los tripomastigotes metacíclicos infecciosos. También la transmisión se puede dar cuando los carnívoros se alimentan de otros animales ya infectados con el parásito. Sin embargo, la infección por *T. cruzi* no suele causar patologías graves en los animales domésticos ni en los salvajes, posiblemente como manifestación de una prolongada co-evolución.

Sin embargo, dado que *T. cruzi* sólo se encuentra en el continente Americano, la infección del hombre ha debido ocurrir hace unos 13000 años, cuando llegaron los primeros pobladores a este continente. Por tanto, *T. cruzi* es un patógeno relativamente reciente para el hombre.

T. cruzi se considera una especie muy heterogénea, formada por diversas cepas y aislados que circulan entre los hospedadores y los insectos vectores. La heterogeneidad de este parásito está siendo ampliamente estudiada por métodos moleculares y podría explicar la gran variedad de manifestaciones clínicas de la enfermedad de Chagas y las diferencias en morbilidad y mortalidad observadas en distintas regiones geográficas. Desde 1999, la especie *T. cruzi* se ha subdividido en 2 linajes: TcI y TcII; el linaje TcII, a su vez, se divide en 5 unidades de tipificación (IIa, IIb, IIc, IId y IIe).

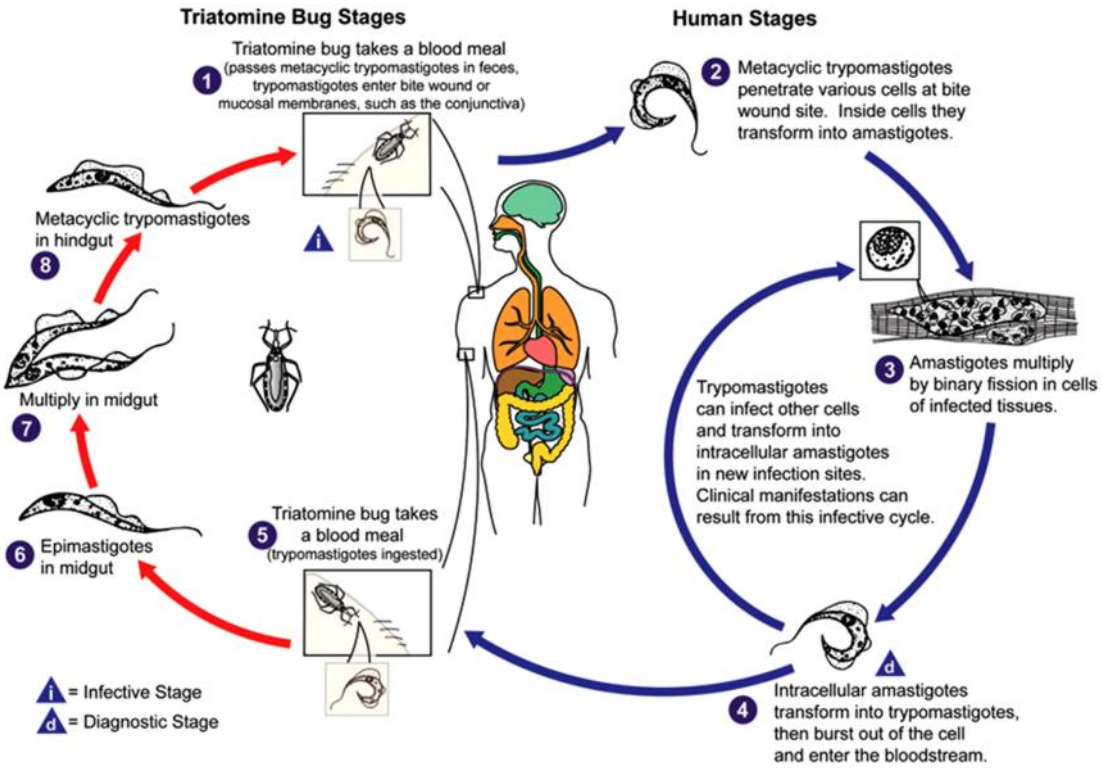


Figura 3. Ciclo de vida de *T. cruzi* en su hospedador vertebrado e invertebrado.

Un insecto vector del género *Triatoma* infectado ingiere sangre del hospedador mamífero y libera tripomastigotes en sus heces cerda del sitio de la herida de la picadura. Los tripomastigotes entran en el huésped a través de la herida o a través de la membrana de mucosas intactas ❶. En el interior del huésped, los tripomastigotes invaden las células ubicadas cerca del sitio de inoculación, donde se diferencian en amastigotes ❷. Los amastigotes se multiplican por fisión binaria ❸ y se diferencian en tripomastigotes, y luego se liberan al torrente sanguíneo ❹.

Estos tripomastigotes infectan células de una gran variedad de tejidos y se transforman en amastigotes intracelulares. Los tripomastigotes del torrente sanguíneo no se replican. La replicación se reanuda cuando los parásitos entran en otra célula o son ingeridos por otro insecto vector que se alimenta de sangre humana o animal que contiene parásitos circulantes ❺. Los tripomastigotes ingeridos se transforman en epimastigotes en el intestino del vector ❻. Los parásitos se multiplican en el intestino ❼ y se diferencian en tripomastigotes metacíclicos infecciosos en el intestino grueso ❽.

Obtenida y adaptada de Clayton (2010)

3. PATOLOGÍA Y DIAGNÓSTICO DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS

3.1 PATOLOGÍA

En la enfermedad de Chagas se distingue una fase aguda y otra crónica o indeterminada.

La fase aguda se inicia con la inoculación por el chinche de los tripanosomas. El hospedador experimenta una reacción de hipersensibilidad frente al parásito como consecuencia de la extensiva destrucción celular en el sitio de la infección inicial. La inflamación local producida en el sitio de la picadura se manifiesta como un pequeño nódulo rojo que se denomina "chagoma", acompañado por una hinchazón de los nódulos linfáticos locales (Fig. 4).

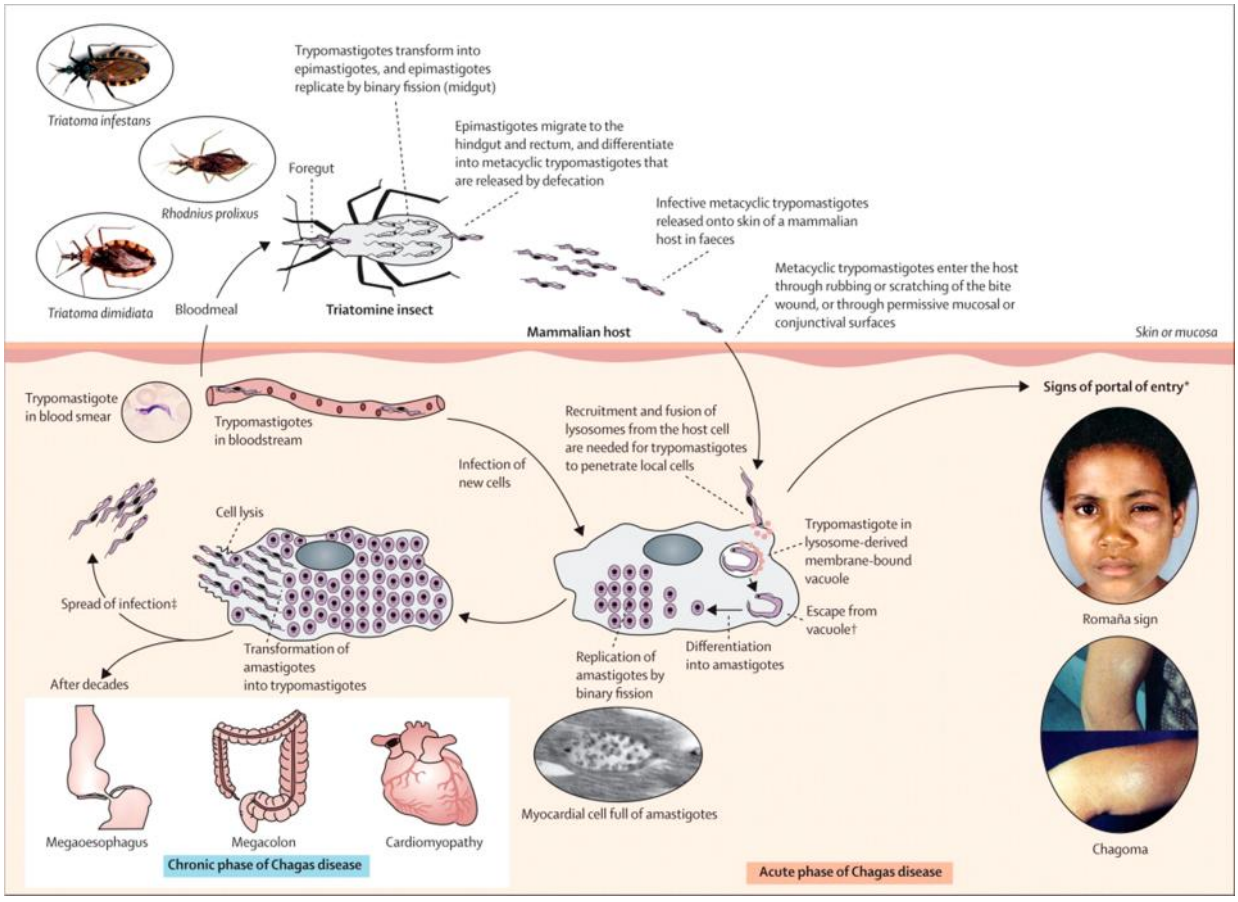


Figura 4: Transmisión vía vector y ciclo de vida de *Trypanosoma cruzi*
La penetración de la membrana mucosa externa del ojo por los trypomastigotes conduce a una reacción indolora de la conjuntiva, con edema unilateral de ambos párpados y linfaneditis de los ganglios preauriculares (signo de Romaña); una picadura en cualquier otra parte de la piel puede conducir a una reacción en el tejido subcutáneo con edema loca y endurecimiento, congestión vascular e infiltración celular (chagoma). Los trypomastigotes en las células hospedadora escapan de la vacuola parasitófora y son liberados al citoplasma por un mecanismo poco común: los trypomastigotes se transforman en amastigotes esféricos que comienzan a replicarse, y cuando la célula local se llena de amastigotes, estos se transforman de nuevo en trypomastigotes con crecimiento del flagelo. Los trypomastigotes lisan las células infectadas, invaden los tejidos adyacentes y se dispersan a través del sistema linfático y el torrente sanguíneo a sitios distantes, principalmente células musculares (cardiacas, musculares y esqueléticas) y células ganglionares, donde llevan a cabo aún más ciclos de multiplicación intracelular.
La imagen ha sido reproducida a partir de Rassi et al. (2010).

En el 50% de los casos, los tripanosomas entran a través de la conjuntiva del ojo, causando un edema en el párpado y la conjuntiva y una hinchazón del nódulo linfático preauricular. Este síntoma es conocido como el "signo de Romaña".

En 1-2 semanas después de la infección, se extienden a los nódulos linfáticos y comienzan a multiplicarse en las células que los fagocitan.

Los amastigotes intracelulares experimentan repetidas divisiones para formar números grandes de parásitos. Después de algunos días, los organismos se diferencian en tripomastigotes y destruyen la célula que los contiene. Entonces, se produce una parasitemia generalizada, y casi cualquier tipo de tejido del cuerpo puede infectarse, aunque los parásitos muestran una preferencia particular por las células musculares y nerviosas. Los cardiomiocitos son uno de los tipos de células que resultan frecuentemente infectados por *T. cruzi*, donde se multiplican y también es un sitio donde el parásito establece un estado de persistencia, lo que explica la alta incidencia de cardiomiopatías en los casos de progresión a enfermedad.

Los síntomas que acompañan a la fase aguda son normalmente suaves; sin embargo, en personas inmunodeprimidas o en niños se pueden desarrollar síntomas más graves como son anemia, pérdida de fuerza, desórdenes nerviosos, escalofríos, dolor muscular y de huesos y distintos grados de fallo cardiaco. La muerte puede acaecer 3-4 semanas después de la infección. La fase aguda es más común y severa entre niños de menos de 5 años. Sin embargo, en muchos casos la infección no es diagnosticada de forma adecuada. Entre los casos sintomáticos, la mortalidad está entre el 5-10% y es el resultado de miocarditis aguda o meningoencefalitis (o ambos). En el 90% restante, las manifestaciones clínicas desaparecen espontáneamente, incluso aún sin tratamiento.

Con el desarrollo de una respuesta inmunitaria, la parasitemia se reduce de forma considerable y los parásitos no se observan en sangre. Esto señala el final de la fase aguda y se inicia la fase crónica de la infección. Entre el 70-85% de las personas infectadas nunca desarrollarán síntomas de enfermedad, y estas personas se consideran que tienen la forma indeterminada de la enfermedad de Chagas. Sin embargo, la mayoría de ellos presentan anticuerpos frente a *T. cruzi* durante toda su vida. El resto de los pacientes, entre el 15-30%, desarrollarán daños orgánicos, dando lugar a las formas cardiacas, digestivas o nerviosas de la enfermedad de Chagas crónica, que pueden aparecer 10-30 años después de la infección inicial. Así, en la fase crónica muchos pacientes son virtualmente asintomáticos cuando inesperadamente sucumben a fallos cardiacos. La enfermedad de Chagas es la causa de alrededor del 70% de las muertes por fallo cardiaco en adultos jóvenes que viven en áreas endémicas.

En la fase crónica de la enfermedad de Chagas, la miocarditis progresiva y mantenida lleva a impedimento de la función contráctil y dilatación de las cuatro cámaras. También son comunes en etapas tempranas observar aneurismas en el ventrículo izquierdo y otras anormalidades en la pared segmental. Un análisis histológico más detallado muestra destrucción generalizada de las células miocárdicas, fibrosis difusa, y edema, entre otras alteraciones (Fig. 5).

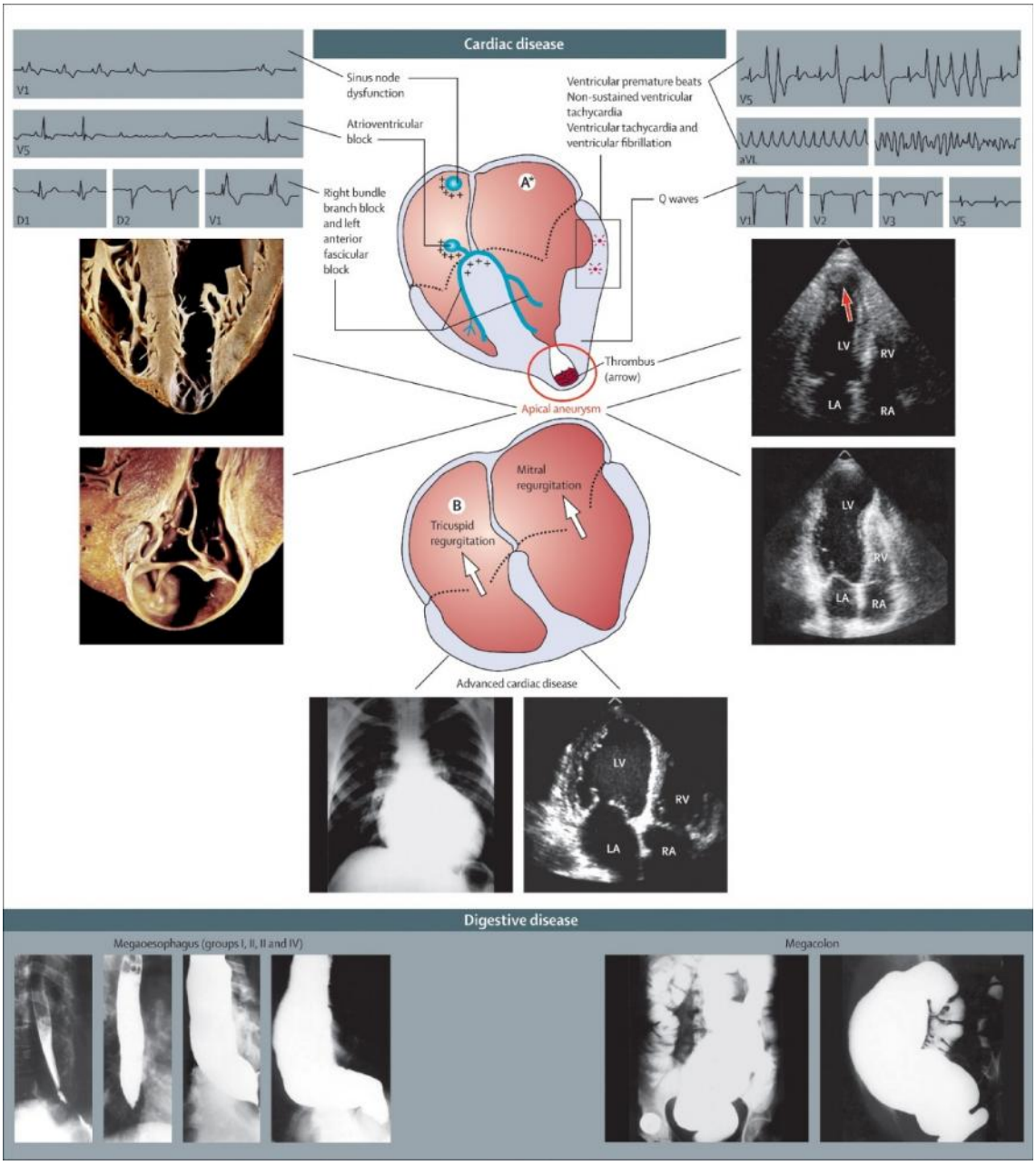


Figura 5: Descubrimientos comunes en la enfermedad de Chagas crónica
(A) Forma segmental crónica. (B) Forma dilatada global cardiaca. * Todos los descubrimientos mostrados para pacientes con la forma segmental cardiaca podrían darse también en pacientes con la forma dilatada global. LV= Ventrículo izquierdo. RV= Ventrículo derecho. LA: Aurícula izquierda. RA: Aurícula derecha.
Las partes de esta figura han sido reproducidas a partir de Rassi et al. (2010)

También se dan casos de reactivación de la enfermedad de Chagas en personas infectadas de forma crónica que experimentan algún proceso de inmunosupresión, tales como la confección con HIV o en casos de recibir fármacos inmunosupresores (Fig. 6).

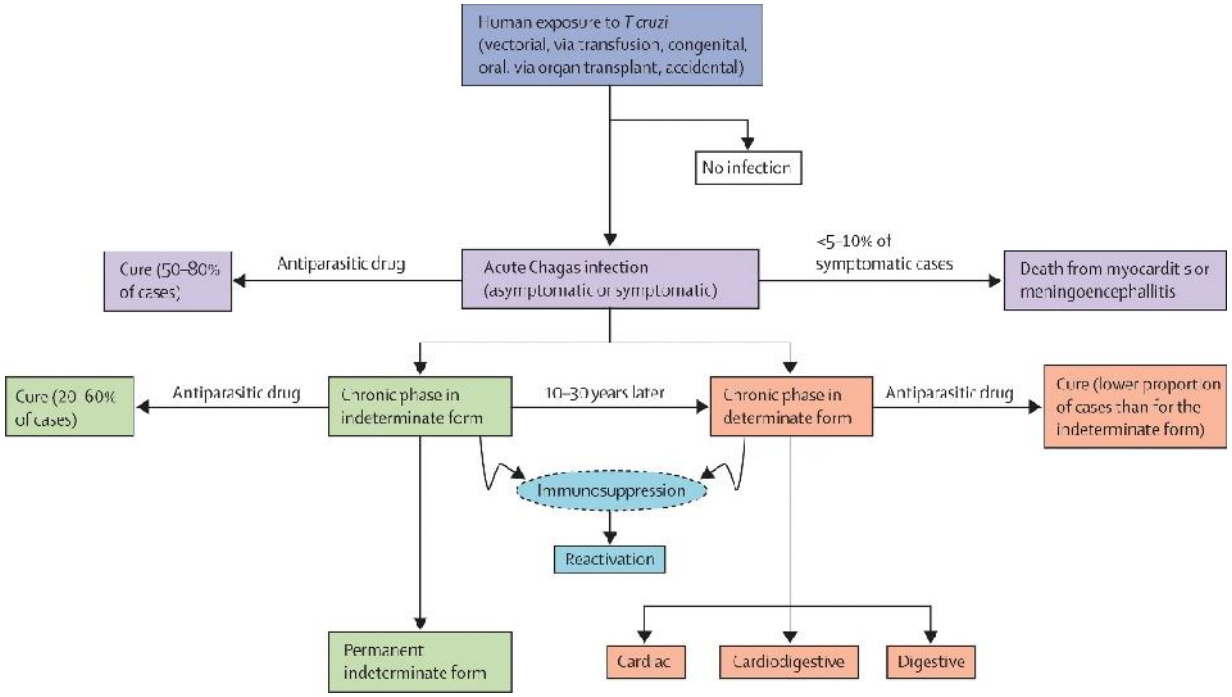


Figura 6: Historia natural de la enfermedad de Chagas en el hombre.
Obtenida de Rassi et al. (2010)

La enfermedad de Chagas se considera un ejemplo claro de cómo una infección puede desencadenar un ataque inmunológico contra los propios tejidos del hospedador.

La escasez de parásitos durante la fase crónica junto al hecho de que durante esta fase se observan algunos síntomas de autoinmunidad, ha llevado a plantear a la autoinmunidad como la causa directa de la enfermedad de Chagas en estos pacientes. Lo que no está claro es si el origen de la autoinmunidad es una consecuencia de un mimetismo molecular entre los antígenos del parásito con los autoantígenos del hospedador o por la presentación de autoantígenos derivados de las células dañadas.

En todo caso, durante la infección crónica, el balance entre la contención del parásito por el sistema inmunitario y el daño por inflamación de los tejidos propios probablemente determina el curso de la enfermedad.

En muchos casos, la infección también puede afectar al esófago o al colon, dañando su tono muscular lo que conduce a hipertrofias conocidas como megaesófago y megacolon, respectivamente.

3.2 TRATAMIENTO

El tratamiento con “benznidazol” o “nifurtimox” es efectivo durante la fase aguda de la infección, pero no existe tratamiento para la fase crónica (Fig. 7). Son los únicos fármacos de eficacia probada contra la enfermedad de Chagas. El nifurtimox se emplea también en el tratamiento de otras tripanosomiasis, como en el de la enfermedad del sueño o tripanosomiasis africana. Generalmente el benznidazol se tolera mejor y es el de primera elección, aunque las tolerancias a estos fármacos varían según la persona, y si se tiene que descontinuar el tratamiento con uno, se puede aplicar el otro.

Los fármacos son derivados de nitroimidazoles, y su grupo nitrilo se reduce a un grupo amino por la acción de una aminoreductasa. Su modo de acción implica la formación de radicales libres y/o metabolitos electrofílicos.

Tanto el benznidazol como el nifurtimox son activos contra las formas tripomastigotes y amastigotes del parásito. Ambos reducen la gravedad de los síntomas y acortan el curso clínico y la duración de la parasitemia detectable. De hecho, se han obtenido índices de curación del 80-90% en el tratamiento de la tripanosomiasis americana aguda tanto con benznidazol como con nifurtimox.

Sin embargo, estos fármacos tienen muchos efectos tóxicos sobre los sistemas nerviosos central y periférico, así como problemas gastrointestinales (náuseas, vómitos y diarreas) y dermatológicos. Debido a esos efectos secundarios su uso no está indicado en pacientes que sufran insuficiencia renal o hepática, y en el caso de embarazadas, puesto que no se ha demostrado que el empleo en el embarazo esté exento de peligros, el tratamiento debe aplazarse hasta después del primer trimestre. A partir de entonces se debe aplicar inmediatamente a fin de evitar el riesgo de transmisión congénita. Los niños suelen presentar menos efectos secundarios y pueden tolerar dosis más altas de ambos fármacos.

Actualmente hay varias líneas de investigación tratando de encontrar un nuevo fármaco que no presente los problemas de toxicidad anteriores, y que pueda servir para tratar la fase crónica. Por ejemplo, la hidroximetilnitrofurazona es un nuevo fármaco candidato con actividad tripanocida, pero todavía no se ha determinado su seguridad.

Figura 7: Fármacos empleados contra la fase aguda de la enfermedad de Chagas. A: beznidazol; B: nifurtimox. El benznidazol se comercializa como Rochagan o Radanil por Roche, o Abrax por ELEA laboratorios. El nifurtimox se comercializa como Lampit por Bayer.
Figura obtenida de:
http://www.bayer.com.ar/noticias/noticias_ver.php?id=471
http://www.unitedpharmacies.com/Radanil-Benznidazol.html
http://www.elea.com/es/productos/1204/354/ABARAX.htm

3.3 DIAGNÓSTICO

Para realizar un diagnóstico de laboratorio apropiado es conveniente tener información sobre la etapa de la infección que se sospecha. Es decir, si se trata de una infección aguda es recomendable agotar las herramientas que permitan detectar al parásito. En cambio, si el individuo se encuentra en la etapa crónica, el diagnóstico de laboratorio se basará, principalmente, en la determinación de anticuerpos. No obstante, el conjunto de los resultados de ambas aproximaciones permite valorar con mayor precisión la evolución del individuo. Cabe mencionar que la infección es de evolución lenta, y que por tanto el seguimiento de los individuos infectados puede durar de 10 a 20 años o incluso toda la vida. Actualmente se recomiendan controles anuales.

Métodos parasitológicos:

El diagnóstico en fase aguda se hace normalmente por demostración de tripanosomas en la sangre, el fluido cerebroespinal, tejidos fijados o linfa.

Los tripomastigotes son muy abundantes en sangre periférica durante la fase aguda, y se detectan fácilmente mediante técnicas de microscopía, pero resultan difíciles de encontrar durante la fase crónica. La detección tradicional de *T. cruzi* se realiza mediante la observación directa de los tripomastigotes en una muestra de sangre, ya sea en un examen en fresco, en una extensión o gota gruesa teñida con Giemsa, después de realizar la prueba de Strout o mediante el microhematocrito (Figuras 8, 9, 10, 11).

Figura 8. Examen en fresco.
Figura obtenida de:
http://slideplayer.es/slide/1115573/#

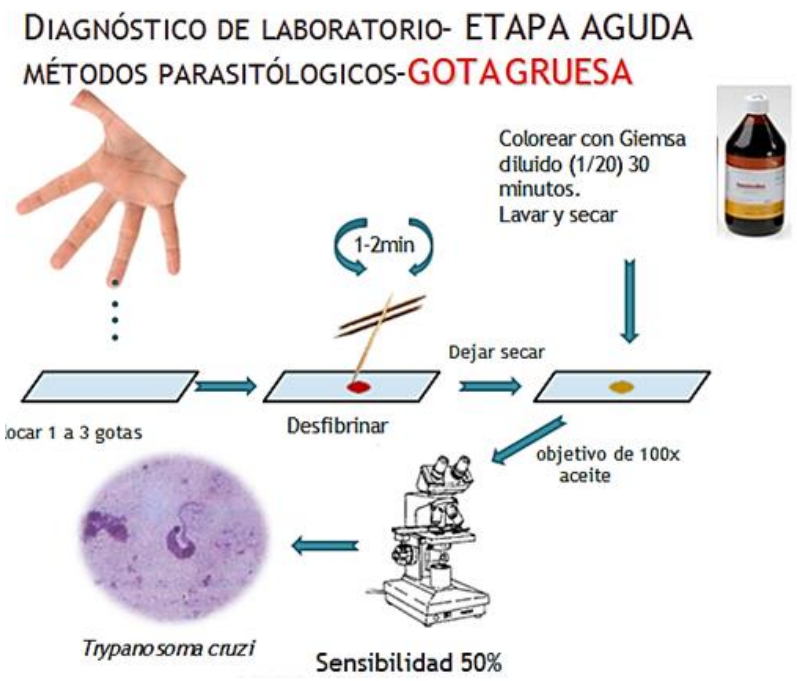


Figura 9. Gota gruesa teñida con Giemsa. Para la identificación morfológica y la diferenciación con *T. rangeli*, es necesario analizar las preparaciones teñidas con Giemsa. Los tripomastigotes de *T. cruzi* se caracterizan por un kinetoplasto prominente, que da la sensación de estar pintado por encima del cuerpo del parásito. Sin embargo, no se puede descartar la dificultad de la diferenciación morfológica de estas 2 especies; por ello, en estos casos es aconsejable recurrir a técnicas moleculares.
Figura obtenida de:
http://slideplayer.es/slide/1115573/#

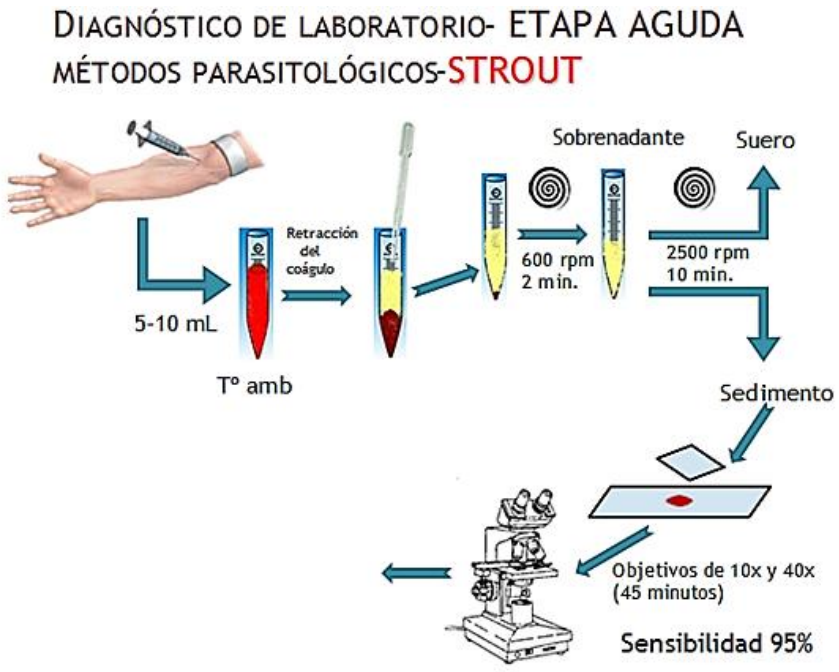


Figura 10. Método de Strout. Consiste en concentrar los parásitos a partir de sangre recogida sin anticoagulante, con incubación a 37 ºC durante 1h para que se retraiga el coágulo y los tripomastigotes queden suspendidos en el sobrenadante. Tras varios ciclos de centrifugación, primero para eliminar los hematíes residuales y luego para concentrar los parásitos, se analiza el sedimento al microscopio.
Figura obtenida de:
http://slideplayer.es/slide/1115573/#

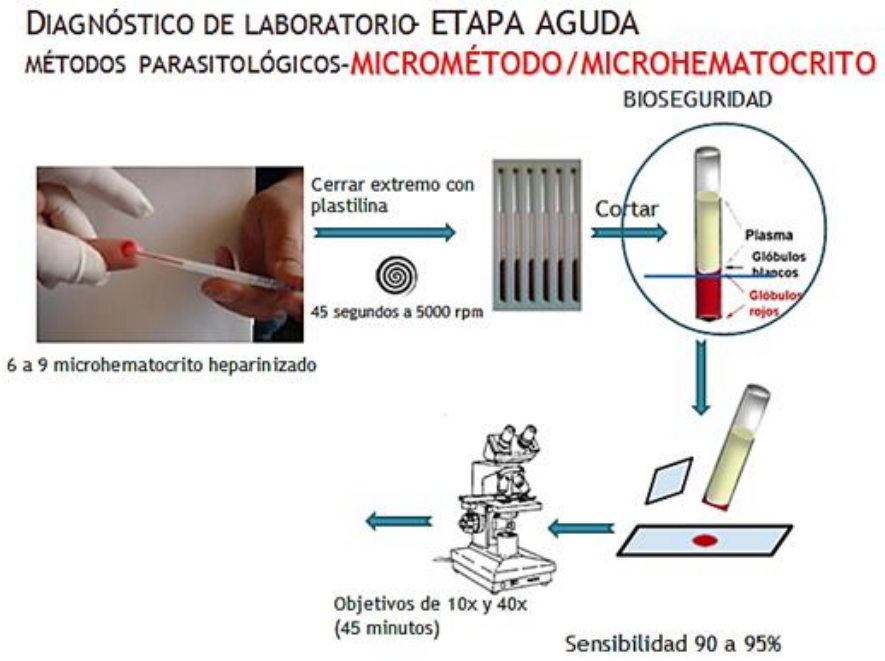


Figura 11. Técnica del tubo capilar heparinizado o microhematocrito. Esta prueba consiste en el análisis del movimiento de los parásitos en la interfase entre el paquete de hematíes y el plasma de 4 a 6 capilares.
Figura obtenida de:
http://slideplayer.es/slide/1115573/#

Un método muy utilizado es el xenodiagnóstico (Fig. 12). A los triatomas, criados en el laboratorio, se les permite picar al paciente. Consiste en utilizar 40 redúvidos repartidos en 2 frascos cubiertos con una malla de tela, que se colocan en la parte interna de los brazos o las piernas del paciente, durante 30 min. En este período, los triatominos que se mantuvieron en ayunas se alimentan de la sangre del paciente. Entonces, después de un periodo apropiado de tiempo (10 a 30 días), se les disecciona y se buscan epimastigotes en el intestino. La técnica se ha modificado a lo largo de los años, y actualmente se puede realizar de forma artificial con la misma sensibilidad que un xenodiagnóstico tradicional; de esta manera se evita la exposición directa del paciente a los triatominos. Esta técnica puede detectar casos en los que los tripanosomas son tan escasos que no se encuentran tras el examen al microscopio de preparaciones de sangre.

Figura 12. Xenodiagnóstico
Figura obtenida de:
http://www.fac.org.ar/fec/chagas2/llave/md2/md204/cornef6.jpg

Otro recurso que permite multiplicar el número de parásitos a partir de una muestra de sangre es el cultivo (Fig. 13). Durante la fase aguda es posible cultivar volúmenes pequeños de muestra en medio NNN tradicional. Dependiendo de la parasitemia inicial, el tiempo para considerar la prueba negativa sería de 180 días.

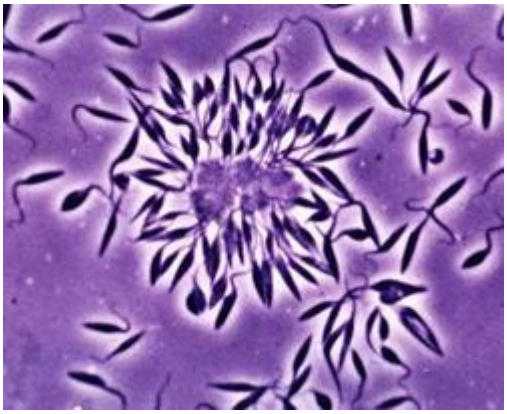


Figura 13. Cultivo de *T. cruzi*
Figura obtenida de:
http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/parasitologia/trypanosomosis.html

Tanto el xenodiagnóstico como el hemocultivo, además de su interés diagnóstico, son herramientas de gran utilidad para el aislamiento de cepas de *T. cruzi* y posteriores estudios de genética de poblaciones.

Las técnicas de inmunodiagnóstico son extremadamente efectivas para el diagnóstico de los casos crónicos, aunque también se producen muchos casos de reacciones falso-positivas si el paciente está infectado con *Leishmania* u otras especies de tripanosomas, e incluso con procesos autoinmunes como es el caso del lupus eritematoso sistémico.

En España, desde 2005, la sangre de donantes procedentes de zonas endémicas es analizada mediante ensayos serológicas frente a *T. cruzi*. El diagnóstico serológico se basa en la determinación de inmunoglobulinas (Ig) G totales anti-*T. cruzi*. Por cuestiones prácticas, se denomina:

- Convencional: si se emplea como antígeno todo el parásito se realiza una inmunofluorescencia indirecta [IFI]. Si lo que se emplea es una mezcla compleja de antígenos del parásito, se realiza una hemoaglutinación indirecta [HAI], o ensayos inmunoenzimáticos [ELISA] (Fig. 14).

- No convencional: cuando los antígenos son purificados, recombinantes o péptidos sintéticos. Dentro de este último grupo destacan las pruebas rápidas en formato de tiras inmunocromatográficas y la aglutinación en tarjeta. Con este tipo de ensayos se requieren de 10 a 15 min para obtener un resultado.

A pesar de los avances tecnológicos, ningún ensayo serológico alcanza el 100% de sensibilidad y especificidad, de manera que el diagnóstico serológico de certeza se basa en la

concordancia de, por lo menos, 2 técnicas de distinto principio y antígenos diferentes. Cuando los resultados son discordantes, es necesario realizar otras pruebas de confirmación y diagnóstico diferencial con otras enfermedades que pueden generar reacciones falsamente positivas.

Figura 14. Izda.: IFI de *T.cruzi.* Centro.: ELISA. Dcha.: kit HAI (hemaglutinación indirecta) para *T.cruzi*
Figura obtenida de:
http://www.laboratorioifi.com.ar/galeria3.htm
http://www.inbios.com/elisas
http://www.cromoion.com/upload/hai%20chagas3%20292x151.jpg

En los últimos años, la detección de ADN mediante PCR se ha constituido en la alternativa más accesible cuando se carece de personal especialista en la identificación y diferenciación morfológica de *T. cruzi*. Aunque su ejecución requiere un tiempo mayor al empleado en una observación directa, es inferior al necesario para la detección de la presencia de parásitos mediante xenodiagnóstico y hemocultivo.

Existen numerosas dianas moleculares que permiten la detección específica de *T. cruzi*; las más utilizadas son el minicírculo del kADN y la secuencia repetida de ADN satélite.

En zonas endémicas, la PCR, desde el punto de vista diagnóstico, sólo se utiliza en estudios de investigación. En los países no endémicos la PCR es una herramienta que se emplea en situaciones puntuales, como por ejemplo en el seguimiento de una sospecha de infección por transfusión sanguínea o trasplante, la reactivación de infección crónica tras un trasplante, en el diagnóstico y confirmación de un Chagas congénito, y en el seguimiento de una infección accidental. En la fase crónica, la PCR es, además, una prueba complementaria, y es útil como criterio parasitológico de seguimiento del tratamiento tripanomicida.

Un caso de especial interés es el diagnóstico y seguimiento de gestantes infectadas. En España se realiza la determinación de anticuerpos anti-*T. cruzi* a todas las mujeres embarazadas procedentes de zonas endémicas, o con riesgo de infección, en cualquier momento de la gestación o incluso en el mismo momento del parto.

Si la prueba efectuada diera un resultado negativo, ni la gestante ni el recién nacido precisan de nuevos controles, salvo si posteriormente se exponen al vector u otro factor de riesgo. Si la prueba fuera positiva, es necesario seguir con el esquema que a continuación se detalla (Fig. 15). Cabe destacar que la sangre de cordón umbilical es útil principalmente para las técnicas de visualización del parásito. Si esta muestra se analiza mediante PCR, se debe tener cuidado con la interpretación del resultado positivo, debido a que en la toma de muestra existe el riesgo de contaminación con sangre materna.

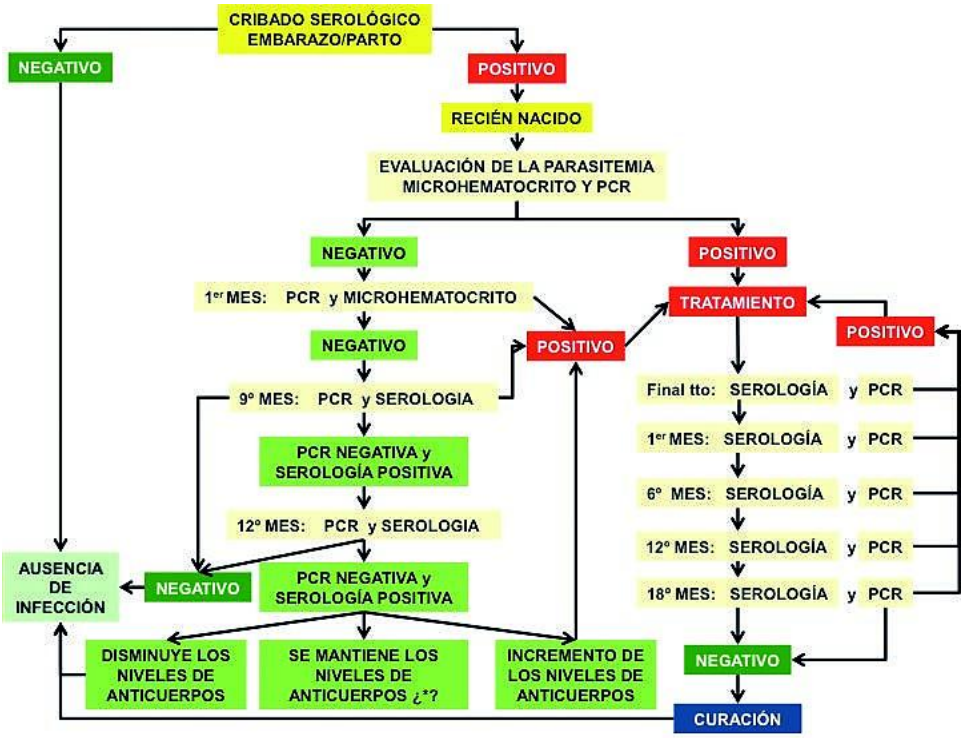


Figura 15. Protocolo de actuación para la detección temprana de la infección congénita por *T. cruzi*.
Figura obtenida de: Merino et al. (2013)

4. INVASIÓN DE CÉLULAS FAGOCÍTICAS Y NO FAGOCÍTICAS

Los macrófagos residentes en los tejidos se piensa que desempeñan un papel importante *in vivo* como una de las primeras células hospedadoras en ser invadidas por *Trypanosoma cruzi*.

Los estudios iniciales demostraron que tanto los tripomastigotes como los epimastigotes son internalizados eficientemente por los macrófagos, y se observan dentro de fagolisosomas. Sin embargo, sólo los tripomastigotes pueden escapar del fagolisosoma y multiplicarse en el citosol, mientras que los epimastigotes son destruidos.

Subsiguientemente, se encontró que si los macrófagos son activados con citoquinas, particularmente IFN-γ, éstos son capaces de matar eficientemente a los tripomastigotes intracelulares.

Los mecanismos por los que los tripomastigotes entran en los macrófagos han sido sujeto de controversia. Mientras que algunos autores publicaron que la entrada es bloqueada por la presencia de inhibidores de la polimerización de actina como es la citocalasina B, otros encontraron que no existe tal inhibición y concluían que la invasión se debía a un proceso activo dirigido por el parásito.

El descubrimiento de una entrada independiente de citocalasina B de los tripomastigotes en células no-fagocíticas ha clarificado este conflicto. En macrófagos, ambos mecanismos (entrada activa y fagocitosis pasiva) pueden ocurrir simultáneamente, lo que puede explicar las observaciones anteriores, aparentemente contradictorias.

4.1. MECANISMO DE INVASIÓN DE CÉLULAS

Fue inesperado encontrar que la invasión de células HeLa o MDCK ("Madin-Darby canine kidney") por *T. cruzi* no es inhibida por la presencia de citocalasina D. Es más, estudios adicionales mostraron que la citocalasina D facilita significativamente la invasión por los tripomastigotes de fibroblastos NRK ("normal rat kidney") y células MDCK polarizadas.

Estos resultados sugieren que el mecanismo de entrada de *T. cruzi* es independiente de la polimerización de actina y que la disgregación del citoesqueleto de alguna forma facilita el proceso. Estos resultados difieren sustancialmente de aquellos observados durante la invasión de la célula hospedadora de muchos patógenos bacterianos.

Estudios morfológicos indicaban que durante la entrada se forman vacuolas unidas a membrana alrededor de los tripomastigotes. La asunción inicial fue que estas vacuolas se originaban a partir de la membrana plasmática de la célula hospedadora. Sin embargo, la presencia de marcadores lisosomales en las vacuolas que rodean a los parásitos hizo pensar que el origen de estas vacuolas sería lisosomal.

En este sentido, se encuentra que cuando se cargan los lisosomas con sacarosa, lo que interfiere con la capacidad de fusión de los lisosomas, se reduce la invasión por *T. cruzi* de células NRK en más del 50%.

El descubrimiento de que los tripanosomas pueden atraer a los lisosomas de la célula hospedadora al sitio de la invasión implica que *T. cruzi* es capaz de disparar un mecanismo de transducción de señales en la célula hospedadora.

El mecanismo de agrupamiento y fusión de lisosomas en el sitio de invasión del parásito no es totalmente entendido, pero sí se han obtenido algunos indicios interesantes. El acceso de los orgánulos tales como lisosomas a la membrana plasmática es normalmente impedido por una capa cortical de filamentos de actina polimerizados que forman un denso armazón justamente debajo de la membrana plasmática de todas las células. Los filamentos de actina son continuamente sintetizados y rotos para acomodar varias funciones dinámicas de la célula tales como la locomoción, la endocitosis y la secreción.

El proceso de penetración celular de *T. cruzi* presenta analogías grandes con la secreción regulada, dado que este último fenómeno también implica el reordenamiento del citoesqueleto cortical y el movimiento de los orgánulos hacia la periferia celular. Bajo condiciones fisiológicas, se sabe que la secreción es regulada al menos en parte por cambios en la concentración citosólica del mensajero secundario Ca^{2+}.

Estudios subsiguientes han descubierto que como consecuencia del contacto del tripomastigote infectivo (pero no con los epimastigotes), las células NRK experimentan elevaciones rápidas y repetidas en los niveles intracelulares de calcio libre. Otros tipos de células también son capaces de responder de esta misma manera.

Por otro lado, cuando se disminuyen los niveles de calcio intracelular en las células hospedadoras se inhibe significativamente la entrada de *T. cruzi*.

A este respecto, es tentativo especular que el tropismo observado in vivo por células musculares y nerviosas puede basarse en la capacidad que estas células tienen para la señalización por calcio.

Un resultado reciente también indica que durante las primeras etapas de la interacción entre el tripomastigote y la célula hospedadora se observa un aumento en la $[Ca^{2+}]$ también en el tripomastigote (Fig. 16). Además, el tamponamiento del Ca^{2+}citosólico de los tripomastigotes con quelantes de $[Ca^{2+}]$ (BAPTA o Quin 2) produce una inhibición de la invasión celular.

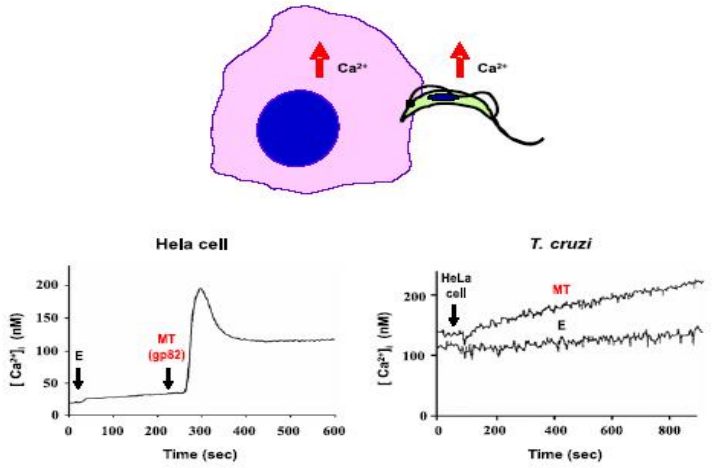


Figura 16. Respuesta de Ca^{2+} inducida por la interacción *T. cruzi*-hospedador. A la izquierda se muestra la movilización transitoria del Ca^{2+} intracelular potenciada en las células HeLa tras la adición, en el tiempo indicado (flecha), de un extracto sonicado de tripomastigotes metacíclicos (MT) o gp82 purificada y nativa. Nótese la ausencia de respuesta tras la adición de extracto de epimastigote no infectivo (E). A la derecha se observa la respuesta de Ca^{2+} inducida en MT, pero no en E, por un extracto sonicado de células HeLa.
Obtenida de Yoshida (2006).

Por tanto, de acuerdo con lo indicado arriba, este mecanismo de señalización por calcio puede estar implicado en la atracción de lisosomas de la célula hospedadora que conducen a la invasión (Fig. 17). Un regulador clave de este proceso es SytVII (synaptotagmin VII), una proteína presente en la membrana lisosomal y que funciona como un sensor de calcio y es un mediador de la fusión regulada de lisosomas a la membrana plasmática. En línea con la relevancia de esta proteína está el hecho de que fibroblastos derivados de ratones deficientes en SytVII son menos susceptibles a ser infectados por *T. cruzi* (~50% menos que las células procedentes de ratones normales).

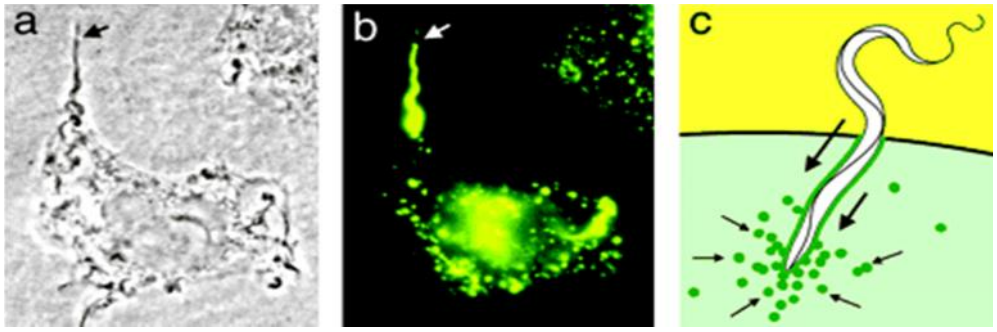


Figura 17. Mecanismo de invasión celular de *T. cruzi* mediado por lisosomas. (a) Imagen de contraste de fases de un tripomastigote en el proceso de entrada a una célula HeLa. La flecha señala la porción extracelular del parásito. (b) Imagen de inmunofluorescencia de la misma célula mostrada en la parte a teñida con anticuerpos contra la proteína humana Lamp-1. La flecha señala la porción extracelular del parásito, todavía no rodeada de membranas con contenido de Lamp-1 (lisosomales). (c) Diagrama del proceso que da lugar a la vacuola intracelular que contiene al tripomastigote. La línea verde representa membranas lisosomales que son gradualmente incorporadas a la vacuola, las flechas pequeñas indican la dirección del movimiento lisosomal y las flechas grandes indican la dirección del movimiento del parásito.
Obtenida de Andrews (2002).

Las imágenes del proceso de invasión en fibroblastos revelan una acumulación gradual de lisosomas de la célula hospedadora en el sitio de entrada del parásito, seguido de una fusión progresiva de estos lisosomas con la membrana plasmática según va progresando la invasión.

La similitud que existe entre la invasión de células por *T. cruzi* y la exocitosis regulada por Ca^{2+} planteó la posibilidad de que el parásito podría estar aprovechando una propiedad, previamente insospechada, de los lisosomas, es decir, la capacidad de movilizarse hacia la periferia celular y fusionarse con la membrana plasmática.

Ahora se ha puesto de manifiesto que la exocitosis de lisosomas es un mecanismo bastante habitual en diversos procesos celulares como, por ejemplo, los gránulos de secreción de células como plaquetas, neutrófilos y linfocitos T citotóxicos, que contienen marcadores lisosomales.

Recientemente, se ha puesto de manifiesto que la exocitosis lisosomal regulada por Ca^{2+} tiene un papel fisiológico en las células de mamífero: la reparación de daños en la membrana plasmática. Toda una serie de estudios indican que la reparación de lesiones en la membrana plasmática de las células animales implica el aporte regulado por Ca^{2+} de membrana intracelular a los sitios dañados. Así, el influjo de Ca^{2+} a través de los "rotos" de la membrana plasmática dispara un incremento de la exocitosis vesicular al sitio del daño, un proceso necesario para restañar la membrana.

Este es un ejemplo que ilustra el enorme potencial que el estudio de las interacciones hospedador-patógeno tiene para descubrir aspectos nuevos y sorprendentes de la fisiología de las células animales. Así, la investigación de una forma muy inusual de invasión de la célula hospedadora por un tripanosoma condujo al descubrimiento de la exocitosis lisosomal regulada por Ca^{2+}, un proceso ampliamente extendido, con un papel central en el mecanismo de reparación de la membrana plasmática. Por tanto, parece evidente que el parásito subvierte un proceso normal para su propio provecho: el contacto con el parásito dispara una respuesta de "reparación" de los lisosomas de la célula hospedadora, que son secuestrados para la formación de la vacuola intracelular.

Estudios recientes han implicado a la PI-3 quinasa en el proceso, dado que el empleo de un inhibidor de esta quinasa, "wortmannin", afecta el proceso de invasión al inhibir la fusión de los lisosomas. La exocitosis de lisosomas ocurre en los lugares de la membrana donde se ha establecido la interacción con el parásito, liberándose esfingomielinasa ácida que va a generar ceramida como resultado de la rotura de esfingomielina, presente en la membrana. La formación de ceramida en la cara externa de la membrana induce entonces la endocitosis de la membrana alterada. Los parásitos aprovechan este proceso para ser internalizados. El proceso requiere de la proteína de unión a Ca^{2+}sinaptotagmina VI y es probablemente facilitado por el movimiento de la kinesina sobre los microtúbulos, que requiere la intervención de Ca^{2+}-calmodulina; esto pone de manifiesto la importancia del Ca^{2+}en el proceso (Fig. 18. 1).

La observación de que el tratamiento de las células con drogas que despolimerizan la actina tenía un efecto aumentador de la eficiencia de entrada del parásito fue inicialmente interpretada como un factor que ayudaba a destruir el citoesqueleto cortical, lo que a su vez beneficiaba el proceso de fusión de los lisosomas a la membrana plasmática. Pero esta asunción se ha

demostrado incorrecta al comprobarse que el tratamiento con citocalasina D impide el tráfico y fusión de lisosomas. Así, estos experimentos revelaron que la dinámica de polimerización/despolimerización de actina se requiere para la fusión de los lisosomas a la membrana plasmática y a las vacuolas parasitóforas.

Estos datos llevaron a investigar la existencia de otros mecanismos de entrada de *T. cruzi* en la célula. Así, se ha encontrado que *T. cruzi* utiliza otras vías de entrada. Una de ellas es la vía endocítica o de invaginación de la membrana plasmática (Fig. 18. 2). Así, estudios del curso de la infección han puesto de manifiesto que aproximadamente el 50% de los tripanosomas que son internalizados se encuentran en vacuolas que son negativas para proteínas LAMP ("lysosome-associated membrane proteins"). La proteína dinamina, una GTPasa que está asociada a la PI3K, podría estar implicada en la formación y dinámica de la maduración de vacuolas.

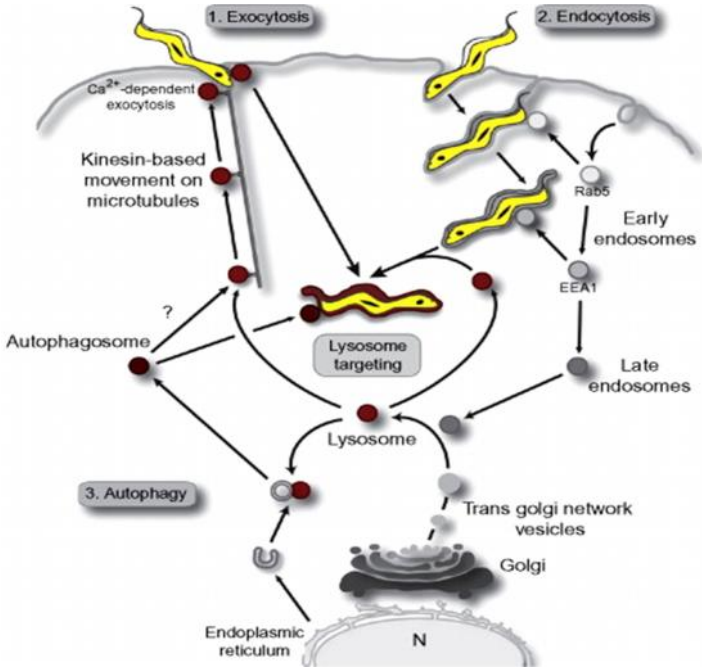


Figura 18. Vías de invasión de la célula huésped por *T. cruzi*. En el camino al compartimento lisosomal de la célula huésped en células fagocíticas no-especializadas los tripomastigotes pueden tomar tres vías principales. La vía 1 involucra el reclutamiento y la exocitosis dirigida de lisosomas de la célula huésped a la membrana plasmática del huésped en el sitio de anclaje del parásito. Los motores de kinesina mueven a los lisosomas sobre los microtúbulos hasta la membrana plasmática del huésped, donde tiene lugar la fusión dependiente de Ca^{2+}. Explotando esta vía, los tripomastigotes evitan otras vías celulares para ir directamente a los lisosomas. La vía 2 involucra la formación de una vacuola derivada de membrana plasmática alrededor de *T. cruzi* que se fusiona con endosomas tempranos, previo a la fusión con lisosomas.
La vía 3 involucra el direccionamiento directo de autofagosomas, que se derivan de la fusión de lisosomas con compartimentos autofágicos tempranos, a la vacuola parasitófora naciente y/o fusión con vacuolas de *T. cruzi* formadas posteriormente a la entrada por otras rutas. La contribución de la ruta autofágica está potenciada en estado de falta de nutrientes para la célula.
Obtenida de Caradonna and Bruleigh (2011).

Recientemente se han publicado algunas observaciones que indicarían una posible implicación del mecanismo de autofagia en el proceso de invasión por *T. cruzi* (Fig. 18. 3). La autofagia es un proceso catabólico que opera en el citoplasma de las células eucarióticas y que tiene la finalidad de degradar orgánulos dañados o excedentes mediante la formación de autofagosomas que se fusionan con los lisosomas. Experimentos con células CHO ("Chinese Hamster Ovary") han mostrado que ~30% de las vacuolas que contienen parásitos se asocian a autofagosomas. De hecho, la activación inducida por falta de nutrientes de la vía autofágica aumenta la entrada del parásito en las células. Además, el papel de la autofagia en el proceso de infección por *T. cruzi* viene apoyado por la menor capacidad del parásito para infectar a células Atg5-/-, proteína implicada en el proceso autofágico, en comparación con las células control.

4.2. MOLÉCULAS DE LA SUPERFICIE DEL PARÁSITO IMPLICADAS EN LA INVASIÓN

El anclaje de *T. cruzi* a las células hospedadoras y la subsiguiente invasión son dos procesos activos que parecen estar sujetos a factores que controla el parásito más que a influencias de la célula hospedadora.

4.2.1. Antígenos de superficie de tripomastigotes

- La primera molécula que implicó en el proceso de invasión fue la **gp90**, una glicoproteína de 90-kDa que se encuentra anclada a la membrana a través de su unión a una molécula de glicosilfosfatidilinositol (GPI). Se une a las células a infectar, pero no desencadena una señal de calcio.
  Un anticuerpo monoclonal frente a gp90 neutraliza las infecciones en ratones inoculados con tripomastigotes metacíclicos e inhibe parcialmente la invasión de células cultivadas. Por tanto, estos experimentos sugieren un papel para esta proteína en la invasión por tripomastigotes metacíclicos. Sin embargo, otros experimentos que sugieren que altos niveles de gp90 en el parásito reducen su capacidad infectiva.

- La **gp82** es una glicoproteína de superficie de 82-kDa. Se piensa que está implicada en el anclaje e invasión de *T. cruzi*, puesto que la invasión del parásito es inhibida con anticuerpos monoclonales frente a esta proteína. Se une a las células a infectar y desencadena una señal de calcio.
  Se ha identificado que gp82 media la interacción del parásito con las células epiteliales del intestino, como paso previo a la invasión producida por ruta oral.

- Una **proteína semejante a mucina de 35/50-kDa** de la superficie de metacíclicos se ha identificado como el principal aceptor en metacíclicos de ácido siálico exógeno en una reacción que implica a la trans-sialidasa de *T. cruzi*. Esta proteína altamente glicosilada es rica en treonina, contiene muchos glicanos unidos por enlaces-O y está anclada a membrana a través de GPI. Se une a la célula a infectar y desencadena una señal de calcio, aunque menor que la producida por la interacción de gp82.
  Consistente con un posible papel en invasión, anticuerpos monoclonales frente a esta proteína inhiben la invasión *in vitro* y neutralizan las infecciones de ratones inoculados con tripomastigotes metacíclicos.

- La **penetrina**, una proteína de 60-kDa que se une específicamente a heparina y colágeno, presente en la superficie de los tripomastigotes sanguíneos, ha sido implicada en el anclaje de los parásitos a las células hospedadoras. La expresión de esta proteína en una cepa de *E. coli*, que normalmente no invade células de mamífero, confiere la habilidad para unirse y penetrar en células Vero.

Ahora se sabe que gp90 y gp82 son moléculas relacionadas que pertenecen a la familia gp85/sialidasa. Algunos miembros de la familia gp85 contienen la secuencia aminoacídica RGD, un motivo conocido de interacción con las integrinas. Además, los miembros de esta subfamilia presentan una secuencia bastante conservada en la región C-terminal, que se denomina dominio FLY (VTVXNVFLYNR). Utilizando un péptido con esta secuencia y mediante técnicas de cromatografía de afinidad se ha podido determinar su unión a citoqueratina-18 (CK-18, "cytokeratin-18"). El pretratamiento de células epiteliales con anticuerpos frente a CK-18 inhibe la invasión por *T. cruzi*. También se ha implicado a estas mucinas, por su resistencia a la degradación por proteasas, como factor importante de protección de los tripomastigotes metacíclicos cuando infectan por la ruta oral.

4.2.2. Trans-sialidasas y papel de las moléculas aceptoras de ácido siálico en la invasión

T. cruzi no puede sintetizar ácidos siálicos; estos azúcares son adquiridos a partir de donantes externos mediante la acción enzimática de la trans-sialidasa. Las trans-sialidasas pertenecen a una gran familia multigénica que codifica un grupo heterogéneo de glicoproteínas enzimáticamente activas con un tamaño que va desde 60-250 kDa.

Esta enzima es expresada en niveles relativamente grandes sobre la superficie de los tripomastigotes, donde se encuentra anclada por GPI, y funciona en la transferencia de ácido siálico unido por enlace $\alpha 2$-3 que está presente en diferentes macromoléculas del hospedador hacia glicoproteínas semejantes a mucina de *T. cruzi*, localizadas sobre la superficie del parásito.

Estos resultados y las observaciones de que un aumento de ácido siálico asociado a la superficie del parásito se correlaciona con una infectividad aumentada indican que las moléculas aceptoras de ácido siálico desempeñan una función importante en el reconocimiento o invasión de las células hospedadoras por los parásitos. Sin embargo, el papel que estas enzimas desempeñan en la infección aún debe ser entendido mejor.

4.2.3. El papel de las peptidasas

La cruzipaina es una enzima de *T. cruzi* responsable de la producción de bradiquinina, que potencia la infección al unirse a su receptor en las células a infectar. En este sentido, el tratamiento de ratones infectados con inhibidores de cruzipaina resulta en su curación.
La oligopeptidasa B es una enzima citosólica responsable de producir un factor soluble responsable de desencadenar una respuesta de calcio en la célula a infectar. Parásitos defectivos en oligopeptidasa B no son capaces de infectar.

4.3. MOLÉCULAS DE SUPERFICIE DE LA CÉLULA HOSPEDADORA

El hecho de que *T. cruzi* pueda invadir muy diferentes tipos de células sugiere que bien emplea un(os) receptor(es) ubicuo(s) o que la heterogeneidad de las glicoproteínas de superficie del parásito comunica la habilidad para unirse a diferentes receptores específicos.

El hecho de que el tratamiento de las células hospedadoras con proteasas o con glicosidasa impida el anclaje e invasión por *T. cruzi*, sugiere que se requieren glicoproteínas en estos procesos.

Recientemente se ha investigado el posible papel de las ß1-integrinas como receptores de la célula hospedadora para el anclaje de *T. cruzi*. Los anticuerpos específicos para las ß1-integrinas tienen un efecto inhibitorio sobre la invasión de los macrófagos por los tripomastigotes. Este anticuerpo también inhibe la unión de la fibronectina a la ß1-integrina. Estos resultados sugieren que, al menos en macrófagos, los parásitos pueden unirse a ß1-integrinas, bien directamente o bien a través de la unión a fibronectina.

Como las integrinas son una familia ubicua de proteínas integrales de membrana que unen la matriz extracelular al citoesqueleto cortical e implicadas en la transducción de señales, son buenos candidatos para mediar los cambios celulares que acompañan a la invasión por *T. cruzi*, tal como el reclutamiento de lisosomas indicado antes.

Otros receptores importantes identificados como parte del proceso son el receptor de TFG, el receptor de bradiquinina, y algunos receptores de tipo TLR.

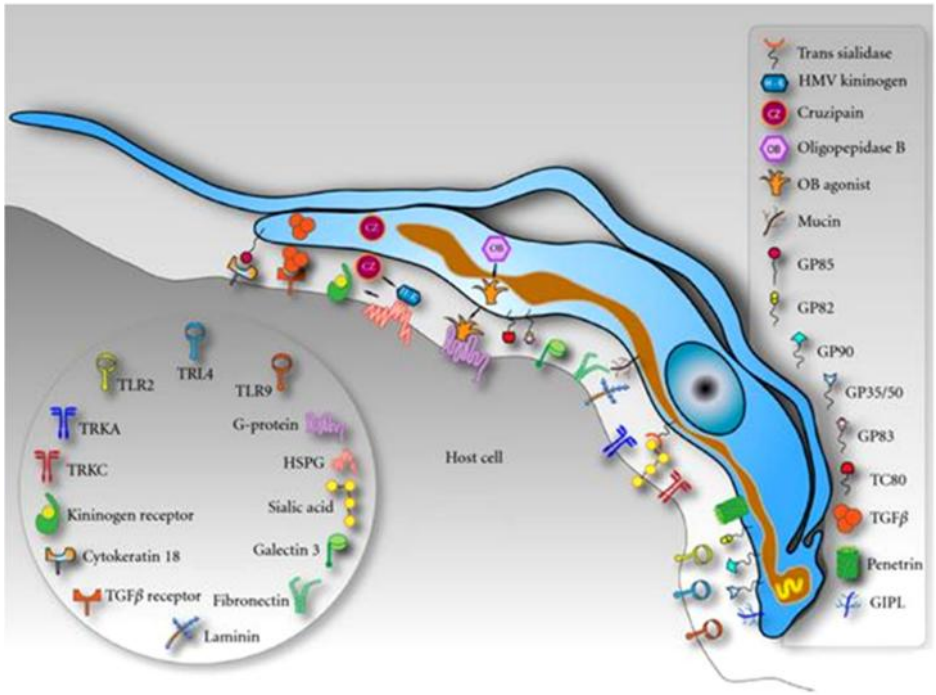


Figura 19. Esquema incluyendo las principales moléculas implicadas en la invasión por *Trypanosoma cruzi*, tanto en el parásito como en la célula hospedadora.
Obtenida de Wanderley de Souza et al. (2010)

4.4. ESCAPE DE LA VACUOLA PARASITÓFORA

Para continuar su ciclo de vida, *T. cruzi* debe escapar de la vacuola membranosa que lo rodea después de la invasión y replicarse como amastigote en el citosol. La membrana de la vacuola parasitófora es gradualmente destruida dentro de la primera hora que sigue a la invasión.

Este proceso requiere de una ambiente ácido, dado que el aumento artificial del pH por el uso de cloroquina retarda el escape.

Existen evidencias que implican a una proteína formadora de poros, TcTox, como participante en la rotura de la vacuola, dado que esta hemolisina es activa a pH bajo y tiene homología con el componente terminal del complemento C9, al igual que con la perforina de ratón, la proteína formadora de poros de los linfocitos T citotóxicos y las células NK.

TcTox forma poros en la vacuola parasitófora, lo que media la salida del parásito al citoplasma de la célula hospedadora. Pero si TcTox funciona como una molécula formadora de poros, ¿cómo consigue el parásito que la proteína no ataque a su membrana? Una posible respuesta parece estar en la trans-sialidasa de *T. cruzi*.

T. cruzi es incapaz de sintetizar ácido siálico, pero expresa una trans-sialidasa/neuraminidasa (TS/N). Esta enzima cataliza la transferencia reversible de grupos sialil desde glicoproteínas donadoras hasta aceptores que contienen residuos ß-galactosil terminales (la actividad trans-sialidasa) o, dependiendo de la concentración de aceptor, la transferencia irreversible del componente sialil al agua, generando así ácido siálico libre (la actividad neuraminidasa).

Los tripomastigotes infectivos expresan altos niveles del enzima, lo que permite al parásito sialilar sus proteínas de superficie. La enzima está unida a la membrana del parásito por anclaje de GPI, y es liberada al pH de la vacuola parasitófora, presumiblemente a través de la acción de una fosfolipasa C.

La cara luminal de la membrana lisosomal está cubierta con glicoproteínas muy glicosiladas (tales como las LAMPs), que pueden desempeñar un papel en proteger a la membrana del ataque de las hidrolasas lisosomales. Esto queda demostrado por el hecho de que líneas celulares defectivas en sialilación sufren una lisis más temprana de su vacuola parasitófora. Estas glicoproteínas de la membrana pueden servir como blancos para la TS/N de *T. cruzi*, y la desialilación de estas moléculas facilita la subsiguiente disrupción de la membrana por TcTox. Al mismo tiempo, la superficie del parásito aumentaría su grado de sialilación, adquiriendo concomitantemente un mayor grado de resistencia frente a su propia proteína formadora de poros.

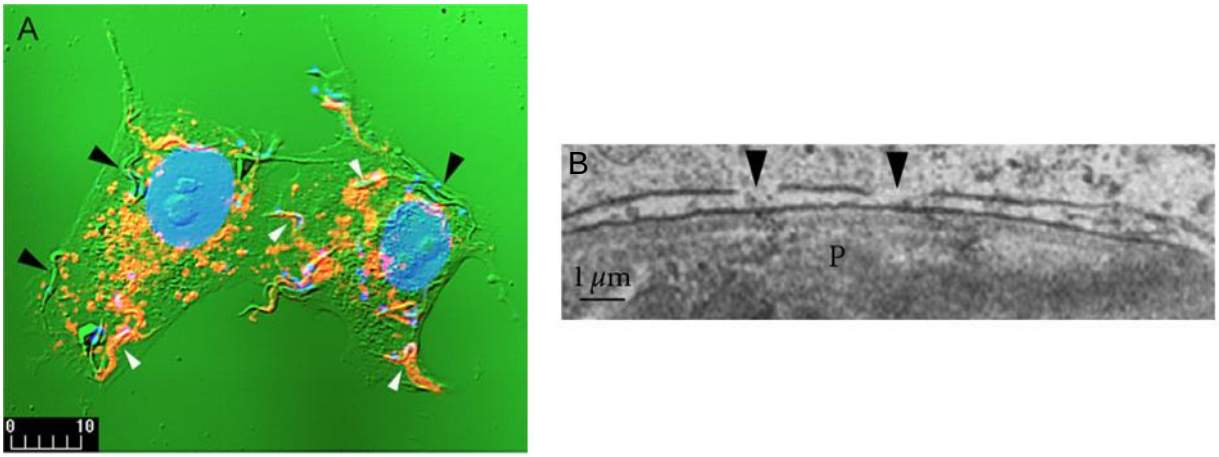


Figura 20. El escape de la vacuola parasitófora observado al microscopio. (A) Tripomastigotes en el interior de vacuolas positivas para LAMP1 (marcadas en rojo, señaladas con flechas blancas) y libres en el citoplasma tras el escape (señalados con flechas negras). (B) Poros en la vacuola parasitófora observados por microscopía electrónica de transmisión. La P señala al parásito, en forma tripomastigote.
Obtenidas de Stecconi-Silva et al. (2003) y Wanderley de Souza et al. (2010)

5. REFERENCIAS

- **Andrews, N.W.** (2002) Lysosomes and the plasma membrane: trypanosomes reveal a secret relationship. J. Cell Biol. 158: 389-394.
- **Barrett, M. P., Burchmore, R. J. S., Stich, A., Lazzari, J. O., Frasch, A. C., Cazzulo, J. J. and Krishna, S.** (2003). The trypanosomiases. Lancet 362: 1469-1480.
- **Barrett, M.P. y Croft, S.L.** (2012) Management of trypanosomiasis and leishmaniasis. Br Med Bull 104:175-196
- **Bern, C., Montgomery, S.P., Herwaldt, B.L., Rassi, A.Jr., Marin-Neto, J.A., Dantas, R.O., Maguire, J.H.** (2007). Evaluation and Treatment of Chagas Disease in the United States. A Systematic Review. JAMA. 298:18
- **Burleigh, B.A. and Andrews, N.W.** (1995) The mechanisms of Trypanosoma cruzi invasion of mammalian cells. Annu. Rev. Microbiol. 49: 175-200.
- **Caradonna, K.L., and Burleigh, B.A.** (2011). Mechanisms of host cell invasion by Trypanosoma cruzi. Adv Parasitol 76: 33-61.
- **Chatelain, E.** (2014). Chagas disease drug discovery: toward a new era. J Biomol Screen I-14
- **Cortez, M., Silva, M.R., Neira, I., Ferreira, D., Sasso, G.R., Luquetti, A.O., Rassi, A., Yoshida, N.** (2006), *Trypanosoma cruzi* surface molecule gp90 downregulates invasion of gastric mucosal epithelium in orally infected mice, Microbes Infect. 8:1, 36-44
- **Davies, C., Dey, N., Sanchez, O., Parada, L.A., Basombrio, M.A., Garg, N.J.** (2014). Hepatotoxicity in mice of a novel anti-parasite drug candidate hydroxymethylnitrofurazone: a comparison with benznidazole. PLOS Neg. Trop.Dis. 8:10
- **Despommier, D.D. y Karapelou, J.W.** (1987) Parasite Life Cycles. Springer-Verlag, New York.
- **Docampo, R. and Moreno, S.N.J.** (1996) The role of Ca2+ in the process of cell invasion by intracellular parasites. Parasitol. Today 12: 61-65.
- **Dutra, W.O., Rocha, M.O.C. and Teixeira, M.M.** (2005) The clinical immunology of human Chagas disease. Trends Parasitol. 21: 581-587.
- **Flores-Chávez, M., Fuentes, I., Gárate, T. y Cañavate, C**. (2007). Diagnóstico de laboratorio de la enfermedad de Chagas importada. Enferm Infecc Microbiol Clin; 25 Supl 3:29-37
- **Girones, N., Cuervo, H. and Fresno, M.** (2005) *Trypanosoma cruzi*-induced molecular mimicry and Chagas' disease. Curr. Top. Microbiol. Immunol. 296: 89-123.
- **Kropf, S.P., Romero, M.** (2009). The discovery of *Trypanosoma cruzi* and Chagas disease (1908-1909): tropical medicine in Brazil.
- **Málaga, S., Yoshida, N.** Targeted reduction of *Trypanosoma cruzi* Surface Glicoprotein gp90 Increases Parasite Infectivity, Infect. Immun. 69:353-359
- **Mauel, J.** (1996) Intracellular survival of protozoan parasites with special reference to Leishmania spp., Toxoplasma gondii and Trypanosoma cruzi. Adv. Parasitol. 38: 1-51.
- **Merino, F.J., Martínez-Ruiz, R., Olabarrieta, I., Merino, P., García-Bujalance, S., Gastañaga, T., Flores-Chavez, M.** (2013). Control de la infección por Trypanosoma cruzi / Enfermedad de Chagas en gestantes Latinoamericanas y sus hijos. Rev Esp Quimioter; 26(3):253-260.
- **Rassi, A., Jr., Rassi, A., and Marin-Neto, J.A.** (2010). Chagas disease. Lancet 375: 1388-1402.
- **Schmidt, G.D. y Roberts, L.S.** (1989) Foundations of Parasitology. Pp. 64-69. Times Mirror/Mosby College Publishing, St. Louis, Missouri.
- **Souza, W., Carvalho, T.M.U., y Barrias, E.S.** (2010), Review on *Trypanosoma cruzi*: Host Cell Interaction, Int. J. Cell Bio. 2010: 295394
- **Stecconi-Silva, RB; Andreoli, WK and Mortara, RA** (2003). Parameters affecting cellular invasion and escape from the parasitophorous vacuole by different infective forms of *Trypanosoma cruzi*. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 98:7, 953-958
- **Umezawa, E.S., Stolf, A.M., Corbett, C.E. and Shikanai-Yasuda, M.A.** (2001) Chagas' disease. Lancet 357: 797-799.
- **Walker, D.M., Oghumu, S., Gupta, G., McGwire, B.S., Drew, M.E. and Satoskar, A.R.** (2014). Mechanisms of cellular invasion by intracellular parasites. Cell Mol Life Sci 71: 1245-1263.
- **Yoshida, N.** (2006) Molecular basis of mammalian cell invasion by *Trypanosoma cruzi*. An. Acad. Bras. Cienc. 78: 87-111.
- **Yoshida, N., Araya, J.E., Dasilveira, J.F., Giorgio, S.** (1993), *Trypanosoma cruzi*: Antibody Production and T Cell Response Induced by Stage-Specific Surface Glycoproteins Purified from Metacyclic Trypomastigotes, Exp. Parasitol. 77:4, 405-413

En la red:

http://www.imbebb.org.br/conteudo.asp?idsecao=242 [Video sobre el ciclo de vida de *T. cruzi* en el hospedador mamífero]
http://www.imbebb.org.br/conteudo.asp?idsecao=243 [Video sobre el ciclo de vida de *T. cruzi* en el hospedador invertebrado]
http://www.imbebb.org.br/conteudo.asp?idsecao=253 [Estructura y componentes celulares de la forma epimastigote]
http://www.imbebb.org.br/conteudo.asp?idsecao=252 [Estructura y componentes celulares de la forma tripomastigote]
http://www.imbebb.org.br/conteudo.asp?idsecao=251 [Estructura y componentes celulares de la forma amastigote]
http://www.who.int/topics/chagas_disease/es/ [Amplia información sobre el parásito y la enfermedad de Chagas]
http://es.wikipedia.org/wiki/Benzinidazol [Información sobre el fármaco Benzinidazol]
http://es.wikipedia.org/wiki/Nifurtimox [Información sobre el fármaco Nifurtimox]
http://apps.who.int/medicinedocs/es/d/Jh2924s/2.11.1.html [Información sobre el tratamiento con Benzinidazol y Nifurtimox]