

**UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE BIOLOGÍA**



**Descripción ultraestructural y molecular del proceso de
la muerte celular en *Trypanosoma evansi***

**TRABAJO ESPECIAL DE GRADO
Presentado ante la ilustre
Universidad Central de Venezuela
por la bachiller Alicia H. Sanabria G.
como requisito para optar al título
de Licenciada en Biología
Tutor: Dr. Roschman Gonzalez**

**Caracas, Venezuela
Mayo-2011**



ACTA

Los abajo firmantes, miembros del jurado designado por el Consejo de la Escuela Biología para examinar el Trabajo Especial de Grado de la Bachiller Alicia Helena Sanabria Guerrero, C.I., V-19.112.305, titulado “Descripción ultraestructural y molecular del proceso de la muerte celular en *Trypanosoma evansi*”, nos hemos reunido hoy, 20 de Mayo de 2011, en la Sala “Jesús María Pacheco” del Instituto de Zoología y Ecología Tropical de la Facultad de Ciencias de la Universidad Central de Venezuela, para atender a la defensa pública de su trabajo, después de lo cual consideramos que amerita la calificación de _____ () puntos. Certificamos así que este Trabajo Especial de Grado cumple con los requisitos exigidos por la Universidad Central de Venezuela para optar al título de Licenciado en Biología.

Lic. Bernardo González
Jurado

Dr. Hector Finol
Jurado

Dr. Roschman González
Tutor

DEDICATORIA

A esas dos personas que me han guiado a lo largo de mis 22 años, que llenaron mi camino de luz, amor y felicidad. Porque me enseñaron a dar siempre lo mejor de mí y no esperaron nunca menos de eso; mis logros hoy son los suyos,
A Betty y Ángel, mis padres.

AGRADECIMIENTOS

A lo largo de la realización de este trabajo tuve el honor de contar con gente que colaboró académica y emocionalmente, y que con su ayuda hoy alcanzo esta meta. Por ello quiero agradecer:

- A mi tutor y amigo el Dr. Roschman González, que me guió en cada paso de la realización de este trabajo, quien calmo mis pequeñas neurosis y siempre tuvo una solución positiva ante los inconvenientes. Gracias por pensar que siempre se puede dar más.
- Al Dr. Héctor Finol, por todo el apoyo en el trabajo del Centro de Microscopía Electrónica, por sus conocimientos y por siempre tomarnos en cuenta, incluso en sus vacaciones.
- Al Dr. Felix Tejero, por siempre estar dispuesto a compartir con nosotros sus grandes conocimientos con paciencia y buen humor.
- A la profesora Alegna Rada, sin su apoyo parte de esta investigación no se hubiera podido realizar. Gracias por siempre recibarnos con entusiasmo.
- Al profesor Bernardo González, por ser un jurado excepcional siempre dispuesto a ayudar y aportar críticas constructivas a este trabajo.
- A mis compañeros y amigos del laboratorio, Fredximar Marrero, Roberto Andrade, Héctor Osorio y Karen Bracale, por estar siempre dispuestos a ayudarnos los unos a los otros.
- A mis amigos de la carrera, Migdelis, Eleinis, Carolina, Raibel, Kimberlyn, Jennifer, Yaremis, Teto, Alejandro, Robert y Erick, que soportaron mis locuras y siempre estuvieron dispuestos a escucharme y acompañarme.

- A mi familia: mi mamá y papá, mi abuelita Alba, mi tío Nelson, mi tía Fronilde, mi madrina Diana y padrino José G, mis primos Isabel, Andrés, Julio, Jojo y Yeyito, quienes hacen que mi vida este completa.
- A mis hermanas blancas, Petrina y Silvana, quienes hicieron de mi residencia un verdadero hogar para mí.

TABLA DE CONTENIDO

INTRODUCCIÓN	8
Reseña histórica.....	8
Distribución geográfica	9
Hospedadores	9
Clasificación Taxonómica	10
Descripción Biológica	10
Ciclo de Vida.....	13
Aislados de <i>T. evansi</i> en Venezuela	14
Muerte Celular.....	14
Muerte Celular en Organismos Unicelulares.....	19
Drogas Tripanocidas.....	21
Justificación.....	23
ANTECEDENTES	25
OBJETIVOS	29
Objetivo General	29
Objetivos Específicos	29
MATERIALES Y MÉTODOS	30
Material Biológico.....	30
Infecciones experimentales.....	30
Experimentos <i>in vitro</i>	31
Diseño experimental.....	32
Métodos	34
I. Procesamiento de la sangre colectada.....	34
Ia. Cuantificación de la parasitemia.	34
Ib. Determinación de las variables morfométricas.....	35

II. Microscopía Electrónica de Transmisión (MET)	36
IIa. Fijación.....	36
IIb. Deshidratación	37
IIc. Infiltración.....	38
IId. Inclusión.....	38
IIe. Corte y contraste.	39
III. Análisis molecular.....	40
IIIb. Aislamiento de ADN genómico a partir de T. evansi.	41
IIIb.1 Electroforesis en geles de agarosa.....	41
IV. Análisis cuantitativo de resultados.....	42
IVa. Análisis de la Varianza (ANOVA).....	42
RESULTADOS	43
I. Procesamiento de la sangre colectada.....	45
Ia. Registro parasitológico.....	45
Ib. Extendidos.....	48
II. Análisis Morfométricos.....	51
III. Ultraestructurales.....	56
IV. Análisis Molecular	87
DISCUSIONES	89
I. Análisis Parasitológico y de Extendidos.....	91
II. Análisis Morfométrico.....	94
III. Análisis Ultraestructural.....	98
IV. Análisis Molecular	107
CONCLUSIONES	110
BIBLIOGRAFÍA	112

INTRODUCCIÓN

Reseña histórica

La primera descripción del *Trypanosoma evansi* fue realizada por Sir Griffith Evans en 1880 (Hoare, 1972). Tras ocho años de controversia, Balbiani, fue el primero en ubicar al agente etiológico de la “Surra” en el género *Trypanosoma* (Hoare, 1972).

Las primeras observaciones de *Trypanosoma evansi* en Venezuela remontan a 1826 cuando Llamozas denominó “epizootia equina” a una afección en los caballos caracterizada por pérdida del control del tren posterior denominada “derrengadera” en lengua vernácula (Canelón & Meléndez, 2003).

A principios del siglo XX, Rafael Rangel (padre de la Parasitología venezolana) realizó estudios que relacionaron al flagelado con las patologías descritas en equinos (Rangel, 1905). Posteriormente, Mesnil recibió los extendidos de sangre de Rangel relacionando tales flagelados con los agentes etiológicos del “Mal de caderas” en Brasil y de la “Surra” en el Viejo Mundo. De acuerdo con sus observaciones y la procedencia de las muestras lo denominó *T. venezuelense* (Mesnil, 1910).

La controversia planteada por Mesnil referente a la identidad taxonómica del flagelado de Rangel se agudizó cuando Leger & Tejera (1920) indicaron que ambos organismos presentaban diferencias morfológicas, inmunológicas y de reactividad farmacológica suficientes como para separarlos en especies diferentes y, posteriormente, Lavier (1929) concluyó que los argumentos esgrimidos no eran suficientemente sólidos para aceptar el epíteto específico *T. venezuelanse*.

Hoare (1956, 1964, 1972) demostró que *T. hippicum*, *T. equinum*, *T. venezuelense* y *T. evansi* no presentan diferencias morfológicas que sustenten la existencia de epítetos específicos diferentes y que las disimilitudes descritas correspondían, simplemente, a “razas geográficas”. Este axioma de Hoare fue corroborado por Gibson *et al.* (1978), Mahmoud &

Gray (1980) y Losos (1980), quedando así zanjada la controversia.

Distribución geográfica

T. evansi es el hemoflagelado más ampliamente distribuido a nivel mundial. Se ha descrito en las regiones Etiópica, Paleártica, Neotropical y Oriental (Luckins, 1988). En Venezuela este parásito se encuentra ubicado mayormente en los llanos, donde se encuentran las poblaciones equinas de mayor importancia en el país.

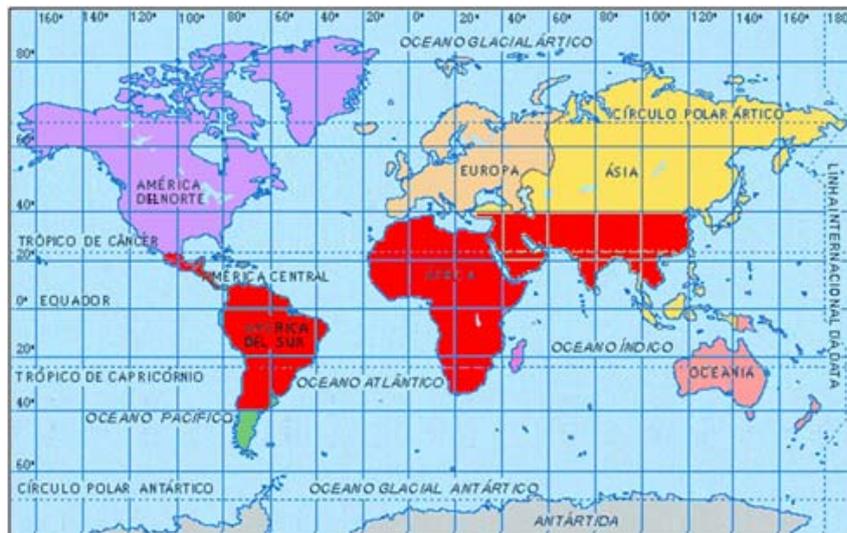


Figura 1. Regiones geográficas y, resaltado en rojo, distribución del *Trypanosoma evansi* (modificado de <http://www.fao.org/>).

Hospedadores

Trypanosoma evansi se trata de un parásito eurixeno descrito en Artiodactyla, Carnivora, Chiroptera, Lagomorpha, Perissodactyla y Rodentia (Boid *et al.*, 1981; Luckins, 1988; Lun *et al.*, 1993; Arias *et al.*, 1997; Brun *et al.*, 1998). En la Región Neotropical se han reseñado infecciones en edentados (Herrera *et al.*, 2002), equinos (Hoare, 1972; Franke *et al.*, 1994; Arias *et al.*, 1997), quirópteros (Hoare, 1964) y roedores (Nunes, y Oshiro, 1990). Según Dávila *et al.* (1998), los equinos son el principal hospedador.

T. evansi es el agente causal de la “Surra”, una de las más comunes y ampliamente distribuidas enfermedades de ganado. Animales asociados a procesos productivos, como camélidos y equinos son los principales hospedadores, de ahí la importancia de la tripanosomosis por *T. evansi* en el rendimiento y la rentabilidad de diversas actividades humanas. La tripanosomosis por *T. evansi* es una enfermedad animal que recientemente ha adquirido matices zoonóticos (Joshi *et al.*, 2005 y Vanhollebeke *et al.*, 2006)

Clasificación Taxonómica

La clasificación taxonómica más actualidad del *T. evansi* ha sido propuesta por Brusca y Brusca (2003):

Dominio: Eukarya

Reino: Protozoa

Phylum: Kinetoplastida

Familia: Trypanosomatidae

Genero: *Trypanosoma*

Sub-genero: *Trypanozoon*

Especie: *T. (T.) evansi*.

Hoare (1972) creó una división que si bien carece de valor taxonómico, es de gran valor práctico, por cuanto organiza a los tripanosomas según el modo en el que alcanzan el torrente circulatorio del hospedador mamífero. Así, los tripanosomas de la Sección Stercoraria infectan a sus hospedadores mamíferos por contaminación con heces del hospedador invertebrado. Por su parte, los tripanosomas de la Sección Salivaria infectan a sus hospedadores mamíferos por inoculación del contenido de las glándulas salivales del hospedador invertebrado. *T. evansi* pertenece a la sección Salivaria.

Descripción Biológica

T. evansi es un hemoflagelado unicelular y monomórfico (sólo tripomastigotes) que

presenta membrana ondulante bien desarrollada y contigua al flagelo libre, cinetoplasto redondeado y pequeño ubicado en el extremo posterior y núcleo redondeado y compacto localizado en posición central (Hoare, 1972). Las dimensiones oscilan entre 18 y 36 μm de largo de 3 a 5 μm de ancho. (Hoare, *op cit.*). En Venezuela se ha reportado que la medida de aislados venezolanos de este parásito oscilan entre: .

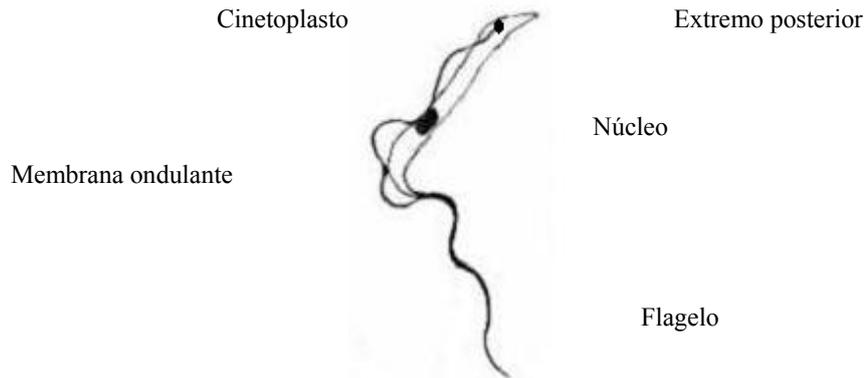


Figura 2. Representación simplificada de *Trypanosoma evansi* (Tomado de <http://biologianet.galeon.com>)

Todos los tripanosomas de la sección Salivaria comparten similitudes ultraestructurales básicas (Vikerman, 1997) como son la membrana plasmática envuelve a una red de microtúbulos subpeliculares que constituyen el principal componente del citoesqueleto de los tripanosomas, siendo además, resistentes al estrés mecánico, térmico y/o inducido por drogas (Souto-Padron *et al.* 1984).

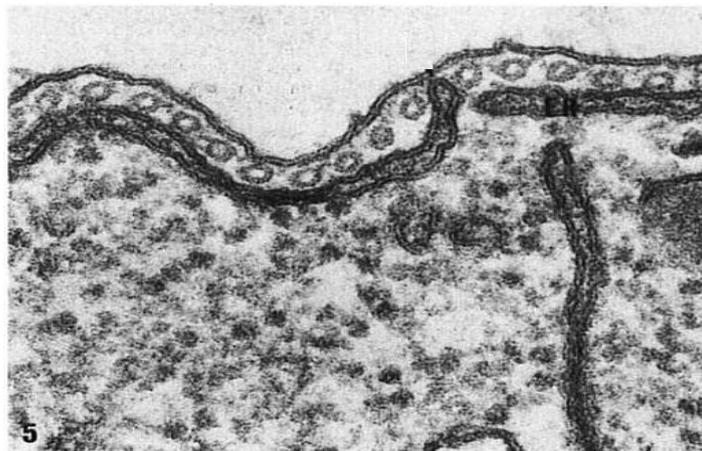


Figura 3. Micrografía electrónica mostrando la red de microtúbulos subpeliculares (Tomado de <http://www.fiocruz.br>)

La ultraestructura del núcleo evidencia el envoltorio nuclear y los poros nucleares, la cromatina condensada en el nucleoplasma y el nucléolo (Elias *et al.* 2001). Durante la división del organismo se observa dispersión de la cromatina, aparición de microtúbulos intracelulares y de placas densas (Solari, 1995).

Todos los tripanosomas, incluyendo *T. evansi*, presentan una mitocondria reticular única que se extiende a lo largo del cuerpo del parásito. En las adyacencias del cuerpo basal del flagelo se localiza una estructura más o menos discoidal que aglomera todo el ADN mitocondrial: el cinetoplasto (Luckins, 1988).

El aparato locomotor de *T. evansi*, al igual que el del resto de los tripanosomatídeos, está formado por un flagelo que emerge a través del saco flagelar y se une a la cubierta superficial del organismo mediante la membrana ondulante; esta estructura locomotora adicional aporta estabilidad al movimiento del tripanosoma en medios viscosos (Brusca y Brusca 2003). El flagelo se origina en el cuerpo basal constituido por nueve pares de microtúbulos dispuestos en anillo y una zona central que tiene un par de microtúbulos centrales (9+2) (De Souza, 1984). Es en el saco flagelar donde acontecen todos los procesos de intercambio con el medio ambiente (Losos 1980).

El citoplasma contiene gran cantidad de gránulos y vesículas que se clasifican morfo-ultraestructuralmente mediante criterios subjetivos de densidad electrónica y tamaño. Los de alta electrodensidad corresponden al grupo de gránulos tipo I: lisosomas; y los de menor densidad electrónica, tipo II, son materiales lipídicos, glico-proteicos o lipo-proteico (De Souza, 1984).

El citoplasma contiene el retículo endoplasmático liso y rugoso que, en ocasiones, aparece íntimamente asociado a la membrana plasmática. Por su parte, el citoplasma también alberga cisternas compatibles con el aparato de Golgi (De Souza, 1984).

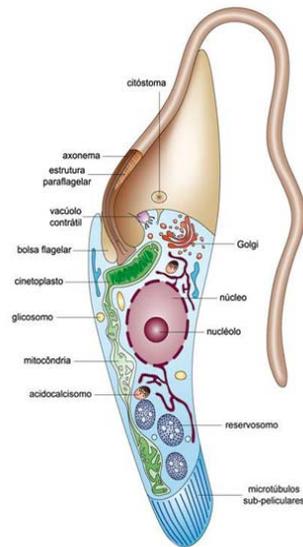


Figura 4. Representación esquemática de la ultraestructura de un tripanosoma
(Tomado de http://www.fiocruz.br/chagas_esp)

Ciclo de Vida

El *T. evansi* pasa de un mamífero a otro a través de la picadura de insectos hematófagos de las familias Glossinidae, Muscidae y Tabanidae que actúan como simples inoculadores mecánicos (Boid *et al.*, 1981 y Brun *et al.*, 1998). Por ello, el parásito tiene un tiempo de sobrevivencia limitado en el aparato bucal del vector. Hoare (1972) establece que en Centro y Sur América *Desmodus rotundus*, actúan a modo de vector y (reservorio) de la enfermedad.

T. evansi se reproduce por fisión binaria longitudinal simple en la sangre del mamífero.

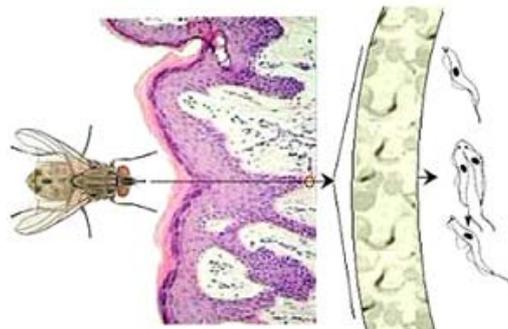


Figura 5. Esquema del ciclo de vida de *Trypanosoma evansi* (Modificado de Gardiner *et al.*, 1988).
El ciclo de vida es una serie de eventos que incluyen reproducción-multiplicación y muerte.

Aislados de *T. evansi* en Venezuela

La infectividad, definida como la habilidad de los tripanosomas para invadir y multiplicarse en un hospedador, es el primer criterio usado para describir la interacción entre tripanosomas patógenos y sus hospedadores (Losos 1.986). Existen entre las cepas de *T. evansi*, tomadas de distintos hospedadores en Venezuela, respuestas a infecciones experimentales diferentes en cuanto a tiempo de prepatencia, sobrevivencia de los animales y duración total de la infección. En el curso de la parasitemia, aislados de caballo, chiguire y asno se comportan con virulencias (número de muertes en función del tiempo) distintas entre sí, siendo las más virulentas las de caballo seguidas por las de chiguire y por último las de asno (Perrone, 2003).

Dependiendo del aislado, se pueden observar cursos de la parasitemia que difieren entre hemoflagelados provenientes de asno, chiguire, y caballo; éstos últimos aumentan progresivamente los flagelados por mL de sangre del hospedador hasta producir la muerte del animal, mientras que el primero y menos virulento muestran una parasitemia de tipo ondulante generando picos de parasitemia (Perrone, 2003).

Las parasitemias ondulantes en el hospedador mamífero se dan por un proceso de variación antigénica. Después de la aparición de una variación antigénica nueva el hospedador producirá una respuesta inmunológica mediada por anticuerpo que eliminará eficientemente la población de parásitos que estén expresando este antígeno. Sin embargo, algunos parásitos cambian este escudo, escapando de la respuesta inmune hasta que el hospedador produzca una nueva respuesta inmune ante este nuevo antígeno. Este proceso da lugar a la clásica progresión de la infección del tripanosoma (Cross, 1996).

Muerte Celular

La muerte celular ha sido definida de manera general como un proceso fisiopatológico que conduce a la eliminación celular. Células moribundas están comprometidas en un proceso que es reversible hasta que se traspasa una primera fase irreversible, o más comúnmente

llamado “punto de no regreso” (Kroemer et al. 2009). Se ha propuesto que este paso puede estar representado por activación masiva de caspasas (Cohen, 1997), pérdida del potencial de membrana de la mitocondria (Green *et al.* 1998), permeabilización completa de la membrana externa de la mitocondria (Green *et al.* 2004) o por exposición a residuos de fosfatidilserina. Sin embargo se han reportado casos en los que las caspasas pueden ser activadas sin implicar procesos letales (Garrido *et al.* 2004), al igual que el potencial de membrana de la mitocondria puede ser disipado por los traslocadores de protones sin implicar una muerte celular inmediata (De Graaf *et al.* 2004) y finalmente la exposiciones a fosfatidilserina pueden ser reversibles por instantes en células granulocíticas como los neutrófilos (Yang *et al.* 2002). De este modo el concepto de punto de restricción para la muerte celular no está todavía definido específicamente.

Al no haber eventos bioquímicos claramente definidos a los cuales se les pueda considerar como “puntos de no regreso”, el Comité de Nomenclatura de Muerte Celular (CNMC) propone que una célula puede ser considerada muerta cuando cualquiera de los siguientes criterios moleculares o morfológicos se presenten:

Tabla 1. Criterios moleculares o morfológicos para definir muerte celular. (Tomado y modificado de Kroemer et al. 2009)

Definición	Notas	Métodos de detección
Pérdida de la integridad de la membrana plasmática	La membrana plasmática se ha roto, resultando en la pérdida de identidad celular.	Microscopía o Citometría de Flujo por la evaluación de la exclusión de colorantes vitales.
Fragmentación celular	La célula, incluyendo su núcleo, ha pasado por fragmentación completa a cuerpos discretos (usualmente referidos como cuerpos apoptóticos).	Microscopía o Citometría de Flujo por cuantificación de eventos hipodiploides.

Inmersión por células adyacentes	Los cadáveres o sus fragmentos han sido fagocitadas por células vecinas.	Microscopía o Citometría de Flujo por estudios de co-localización.
----------------------------------	--	--

Partiendo de esto podemos definir cuatro modos de muerte celular con características morfológicas y bioquímicas particulares; además podemos hablar de ocho definiciones tentativas de modalidades atípicas de muerte celular.

Las células pueden cometer un suicidio intencional conocido como apoptosis y ésta se basa en un mecanismo genético que involucra señalización y casacadas de reacción (Majno y Joris, 1995). La apoptosis viene acompañada de una serie de características morfológicas y bioquímicas que permiten su identificación a partir de la aparición de varias de estas características. Morfológicamente la célula apoptótica se muestra redondeada, con retracción de pseudópodos, reducción del volumen celular o picnosis, condensación de la cromatina, fragmentación de la cromatina, fragmentación nuclear, sin o con pequeñas modificaciones ultraestructurales de los organelos citoplasmáticos, “ampollamiento” de la membrana plasmática sin ocasionar daños en su integridad y fagocitosis por fagocitos residentes (Kroemer et al. 2009). Las características bioquímicas para la detección de células apoptóticas incluyen la activación de una serie de proteínas pro-apoptóticas de la familia Bcl-2, activación de caspasas, disipación del potencial de membrana de la mitocondria, fragmentación de ADN oligonucleosomal, ruptura de la membrana plasmática (en los últimas fases del proceso), sobre-generación de especies de oxígeno reactivo y acumulación de ADNcs (Kroemer et al. 2007 y Kumar, 2007).

Según Welburn *et al.* (2006), la apoptosis puede deberse a la acción patogénica de agentes tóxicos, traumáticos e hipóxicos.

Por otro lado la “muerte celular autofágica” se puede distinguir morfológicamente (eficientemente mediante microscopia electrónica de transmisión) como un modo de muerte celular que involucra: ausencia de condensación de la cromatina, masiva vacuolización del citoplasma, acumulación de vacuolas autofágicas caracterizadas por la

presencia de doble membrana y poca o nula toma por parte de las células fagocíticas (Baehrecke, 2005). Aun cuando la expresión “muerte celular autofágica” nos invita a pensar que la muerte celular es ejecutada por autofagia mientras que en realidad el término simplemente describe muerte celular con autofagia (Levine *et al.* 2005). A pesar de la limitada cantidad de estudios que investigan muerte celular *In Vivo*, no hay dudas de que la autofagia promueve la supervivencia de la célula (Neufeld *et al.* 2008).

La muerte celular por necrosis puede por su parte ser caracterizada morfológicamente por aumento del volumen celular, hinchamiento de los organelos, ruptura de la membrana plasmática y pérdida subsecuente del contenido intracelular (Kroemer *et al.* 2009). Este término necrosis describe cualquier forma de muerte celular por daño mayor incompatible con la vida (Soti *et al.* 2003). Por su parte, eventos infecciosos, neoplásicos o inflamatorios son capaces de liberar enzimas lisosomales como causa que desencadena una cascada de circunstancias conducentes a la muerte celular (Kanduc *et al.* 2002).

La necrosis ha sido considerada como una muerte celular accidental y descontrolada, contrario a esto se ha ido acumulando información que evidencia que este tipo de muerte celular puede ser regulada por diversas señales de transducción y mecanismos catabólicos (Golstein *et al.* 2007). Debido a la ausencia de un consenso en los cambios bioquímicos que pueden ser usados inequívocamente para identificar necrosis, ésta es ampliamente identificada en términos negativos por la ausencia de marcadores de apoptosis y autofagia.

Finalmente entre los cuatro tipos de muerte celular definidos se encuentra la cornificación, la cual es un tipo de MCP (muerte celular programada), bastante específica que tiene lugar en la epidermis y que es diferenciable morfológica y bioquímicamente de la apoptosis. Esta muerte celular desencadena la formación de corneocitos; estos son queratinocitos muertos que contienen proteínas y lípidos específicos y que son esenciales para las funciones de resistencia mecánica, elasticidad y estabilidad estructural de la epidermis (Lippens *et al.* 2005). Entre las características morfológicas más relevantes están, eliminación de organelos citosólicos, modificación de la membrana plasmática, acumulación de lípidos en gránulos, extrusión de lípidos al espacio extracelular y pérdida de los corneocitos por activación de proteasas (Kroemer *et al.* 2009).

Las definiciones tentativas de modalidades atípicas de muerte celular engloban a la “catástrofe mitótica”, “anoikis”, “excitotoxicidad”, “degeneración de Wallerian”, “paraptosis”, “piroptosis”, “pironecrosis” y “entosis” (Kroemer et al. 2009). A continuación se presentarán las principales características que definen estas terminologías.

La “catástrofe mitótica” es un modo de muerte celular que puede darse durante o corto período después de una mitosis fallido o desregulada, esta es acompañada de alteraciones morfológicas que incluyen micronucleación o multinucleación (Vakifahmetoglu *et al.* 2008). Sin embargo este término no es ampliamente utilizado y este modo de muerte celular puede llevar a morfologías típicas de la apoptosis o de necrosis (Roninson *et al.* 2001)).

La “anoikis” ha sido llamada por (Gilmore, 2005), como una apoptosis inducida por la pérdida de la adhesión a un substrato o a otras células. Muy aparte de la forma específica en la que es inducida, los mecanismos moleculares que han sido asociados a la “anoikis” igualan aquellos que son activados durante un proceso clásico de apoptosis (Grossman, 2002). Es por ello que la CNMC reconoce el uso de este término por razones históricas, siendo ya bastante difuso en la literatura (Kroemer et al. 2009).

Por su parte la “excitotoxicidad” es una forma de muerte celular que tiene lugar en las neuronas que han sido “desafiadas” con aminoácidos excitatorios. Entre estos están el glutamato, que promueve la apertura de un canal que produce una sobre carga de calcio citosólico y que a su vez es capaz de activar vías letales de señalización como las que involucran al ion calcio (Orrenius *et al.* 2003). Debido a que este tipo de muerte celular se encuentra sesgado con otros tipos de muerte como apoptosis y necrosis, la “excitotoxicidad” no puede ser considerada como una modalidad de muerte celular independiente (Kroemer et al. 2009).

La “degeneración de Wallerian” es un proceso que resulta cuando una fibra nerviosa es cortada o aplastada, en la cual la parte del axón separado del cuerpo celular neuronal degenera distal a la injuria sin afectar el cuerpo celular principal (Luo y O’Leary, 2005). Sin

embargo este término no describe un tipo de muerte celular como tal, ya que las neuronas afectadas por la “degeneración de Wallerian” se mantienen vivas (Raff *et al.* 2002).

La “paraptosis” es un término que fue introducido originalmente para describir un tipo de MCP con distinciones morfológicas y bioquímicas de la apoptosis (Sperandio *et al.* 2000). Esta ha sido asociado en múltiples tipos de células con vacuolización citoplasmática extensiva e hinchamiento mitocondrial; sigue siendo confuso actualmente si la paraptosis representa una ruta de muerte celular que sea realmente diferente a las demás (Kroemer *et al.* 2009).

La “piroptosis” es una forma de MCP que ha sido asociada con respuestas antimicrobiales durante la inflamación y que contrario a la apoptosis requiere la función de la caspasa-1 (Fink *et al.* 2008). Así mismo se mostrado que la caspasa-1 es activada por un gran complejo supramolecular denominado pirotosoma, éste se forma en los macrófagos a corto tiempo luego de la infección (Fernandes-Alnemri *et al.* 2007). Los macrófagos que pasan por piroptosis exhiben características morfológicas típicas de la apoptosis, como también algunos rasgos asociados con necrosis (Labbe y Saleh, 2008). Otro modo de muerte celular que juega un rol en el sistema inmune innato es la “pironecrosis, esta se distingue de la piroptosis básicamente en que la última requiere de la caspasa-1; queda por ser determinado si estos dos tipos de muerte juegan algún papel fuera del sistema inmune innato (Ting *et al.* 2008).

Finalmente, la “entosis” ha sido reportada como una nueva modalidad de muerte celular, en la cual una célula engulle a otra célula viva vecina, que posteriormente muere dentro de un fagosoma (Overholtzer *et al.* 2007). Sin embargo se continúa estudiando si esta morfología de célula dentro de célula realmente representa una nueva modalidad de muerte celular (Doukometzidis y Hengartner, 2008).

Muerte Celular en Organismos Unicelulares

Si bien en los organismos multicelulares los procesos de muerte celular son bien conocidos,

y se han descrito y documentado profusamente mediante dos mecanismos particulares, como son apoptosis y necrosis, no existe información referente a la muerte de *T. evansi*.

La MCP es de significancia en la supervivencia de los organismos multicelulares y, además, responsable de la eliminación programada de células durante procesos de desarrollo, neoplásicos o, simplemente, de recambio de células dañadas (Clarke *et al.*, 1993). Esta respuesta “suicida” es claramente altruista asegurando la supervivencia del organismo completo mediante la eliminación de unas cuantas células. En lo referente a microeucariotas patógenos, De Souza *et al.* (2003) han destacado el papel desempeñado por la MCP en las relaciones parásito-hospedador, por cuanto los parásitos son capaces de inducir respuestas apoptóticas en las células parasitadas del hospedador, inhibiendo o promoviendo en consecuencia, la subsistencia del propio parásito. De Souza *et al.* (2006), han propuesto que la apoptosis parasitaria, además de representar un medio de evasión de la respuesta inflamatoria del hospedador, contribuye a la dispersión y supervivencia del parásito.

Si bien las características de la MCP en *Dictyostelium discoideum*, una ameba de suelo cuyo ciclo de vida incluye formas unicelulares y multicelulares, sugieren la coexistencia de mecanismos apoptóticos propios de organismos unicelulares y pluricelulares, la existencia de tales eventos en protozoarios ha sido cuestionada, ya que la noción de “suicidio” altruista en un microeucariota unicelular pareciera ser contradictoria (Welburn *et al.* 2006).

Diversas formas de MCP han sido descritas en *T. cruzi*, *T. brucei* y *L. amazonensis* (Ameisen *et al.*, 1995; Moreira *et al.*, 1995; Welburn *et al.*, 1996), respectivamente. En este contexto, es oportuno comentar que estos tripanosomatídeos presentan características ultraestructurales y bioquímicas similares que se han asociado a procesos apoptóticos (De Souza *et al.* 2006).

Raff (1992) sugiere que algunos metazoarios utilizan la MCP a modo de auto-regulación y control “social” de las poblaciones celulares. Considerando que la estructura de las poblaciones de los tripanosomas son de tipo clonal, poseer un mecanismo de control desinteresado en la supervivencia individual que promueva y mantenga la estabilidad

genética en la población, representaría una ventaja adaptativa importante, ya que el crecimiento incontrolado precipitaría la muerte temprana del hospedador invertebrado o vertebrado, disminuyendo así, las probabilidades de completar exitosamente el ciclo de vida (Welburn *et al.* 2006). En consecuencia, no es descabellado suponer que los tripanosomatídeos posean eventos de MCP. En tal sentido, las fluctuaciones parasitémicas características de muchos *Salivaria*, no sólo reflejarían los intentos del sistema inmune del hospedador vertebrado por controlar la infección, sino que también evidenciarían la capacidad del parásito para regular la densidad de sus poblaciones.

La MCP también ha sido observada *in vitro*, aceptándose en consecuencia, la regulación de las densidades poblacionales de modo tal que se adecúen a las condiciones tróficas del cultivo (Hesse *et al.* 1995). Así, las mayores densidades poblacionales sólo podrían alcanzarse con cambios totales del medio de cultivo, por cuanto ni siquiera la adición de medio o suero frescos permite la recuperación del número de individuos presentes en las poblaciones cultivadas. Hesse *et al.* (*op. cit.*) indican que tales circunstancias sugieren la presencia factores derivados de los tripanosomas que se acumula durante su crecimiento *in vitro* y que, además, está relacionado con la regulación poblacional.

Drogas Tripanocidas

Para combatir las enfermedades producidas por hemoparásitos se han desarrollado drogas tripanocidas, que han resultado poco eficientes debido a la tripanotolerancia (Rodríguez-Morales, 2005) y a que algunas de ellas tienen efectos delétereos en el hospedador (Algranati *et al.* 2006), por ello surge la necesidad de encontrar nuevas drogas capaces de contrarrestar las enfermedades causadas por hemoparásitos (Castro *et al.*, 2008).

A lo largo de las últimas décadas se desarrollaron drogas quimioprolácticas que proporcionaron protección efectiva contra la infección con *T. brucei* en caballos, camellos y ganados (Peña, 2000). Entre estas drogas se encuentra el cloruro de isometamidio que es la más empleada así como la menos costosa (Goodman, 1990).

Estas drogas presentan una actividad profiláctica y terapéutica importante, sin embargo el elevado precio que estas presentan así como la toxicidad que generan en los animales, lleva a buscar soluciones más efectivas como tratamiento. La necesidad de desarrollar nuevas y mejores quimioterapias es entonces inaplazable para la disminución de los daños al hospedador durante una infección.

Del incremento de los conocimientos tanto bioquímicos como fisiológicos del agente etiológico, se ha logrado el desarrollo de fármacos con eficientes resultados. Dichos fármacos se pueden clasificar en cuatro grupos de acuerdo al mecanismo de acción que utilizan: inhibidores de la biosíntesis de esteroides (IBE), inhibidores de las cistein-proteasas (ICP), inhibidores de purinas (IP) e inhibidores del metabolismo de pirofosfato (IMPP); siendo los últimos los de importancia para este trabajo.

La actividad de los inhibidores del metabolismo de pirofosfato se basa en la acción sobre un organelo especializado que poseen los *Trypanosomatidae* y los *Apicomplexa* llamado acidocalcisoma. Este organelo está encargado de almacenar PPi, calcio, magnesio, sodio, potasio y otros cationes (Docampo, 2001 y Mendoza *et al.*, 2002). La entrada y salida de estos cationes está regulada por transportadores, canales e intercambiadores presentes en los acidocalcisomas que permiten ejercer una función osmoreguladora (calcio ATPasas, intercambiadores Na^+/H^+ , bombas H^+/ATP asas, y pirofosfatasa, entre otros) (Docampo, 2008).

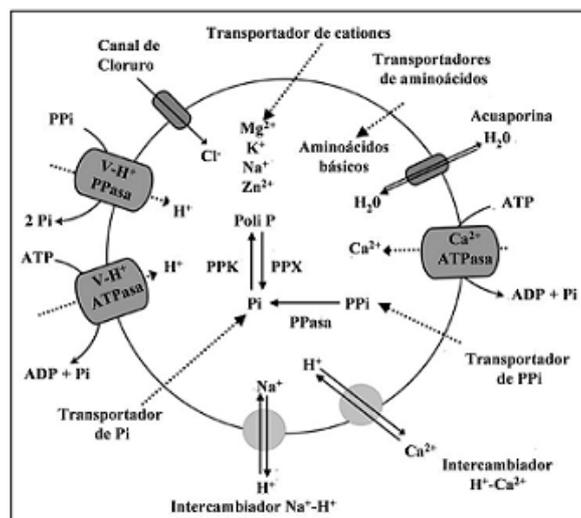


Figura 6. Representación esquemática de un acidocalcisoma (Tomado de Docampo, 2008)

Ciertas enzimas como la pirofosfatasa dependen del PPI, que se encuentra en la matriz del acidocalcisoma, para ejercer su actividad metabólica. La utilización de inhibidores contra estas enzimas las hacen un efectivo blanco terapéutico. Es así entonces como los bisfosfonatos (análogos no hidrolizables de los pirofosfatos) son inhibidores de la pirofosfatasa y han mostrado efectividad-inhibición de la proliferación de estos parásitos en humanos (Urbina *et al.*, 1999; Martin *et al.*, 2001; Montalvetti *et al.*, 2003).

La utilización de tratamientos para la producción de muerte celular en los parásitos es altamente común, incluso se han establecido inductores para estudiar dichos procesos dentro del agente etiológico. Entre estos resaltan los agente quimioterapéuticos junto con otras alternativas (Soeiro *et al.*, 2008).

Justificación

Las secuelas socioeconómicas y sanitaria dejadas por la tripanosomosis por *T. evansi* son tan significativas que la Organización Internacional de Epizootias (OIE) la considera una de las enfermedades transmisibles de mayor relevancia mundial (www.oie.int). Entre los mamíferos afectados en América del Sur destacan caballos (Hoare, 1972), asnos (*E. asinus*) (Tejera, 1920), chigüires (*Hydrochoerys hydrochaeris*) (Mingone, 1910 y Morales *et al.*, 1976), perros (*Canis familiaris*) (Rangel, 1905), ocelotes (*Felis pardalis*) (Shaw, 1977), coatíes (*Nasua nasua*) (Nunes *et al.*, 1990), murciélagos hematófagos (*Desmodus rotundus*) (Hoare, 1965), ratas arroceras (*Oryzomys sp.*) y cachicamos (*Dasypus sp.*) (Herrera *et al.*, 2002).

En Venezuela esta tripanosomosis se asocia a importantes pérdidas en la producción bovina, la economía agropecuaria (Rivera, 1996) y las condiciones socioeconómicas de los pobladores de las zonas afectadas, según Canelón & Meléndez (2003), debido a la abundancia de hospedadores susceptibles y vectores mecánicos que existen en los Llanos venezolanos. Aún así las investigaciones especializadas (no históricas) en la biología de *T. evansi* en el ámbito nacional son escasas (Tejero & Arispe, 1984; Quiñones-Mateu *et al.*, 1994; Rossi *et al.*, 1999; Finol *et al.*, 2001; Perrone *et al.*, 2006; Rossi *et al.*, 2008; Tejero *et*

al., 2008, 2009a, 2009b, 2010; Perrone *et al.*, 2009).

Además dentro de estos escasos estudios sobre la tripanosomosis, los esfuerzos han estado dirigidos hacia el análisis de vías en las cuales los parásitos pueden ser eliminados debido a el efecto de drogas, anticuerpos entre otros, que pueden ocasionar resistencia del parásito e incluso efectos secundarios indeseables para el hospedador. Mucho menos atención se ha puesto en examinar y estudiar a profundidad los procesos naturales de muerte, que pueden limitar el crecimiento del parásito y representar un aporte para una nueva estrategia de control.

ANTECEDENTES

Las investigaciones ultraestructurales adelantadas con *T. evansi* en Venezuela son insuficientes, y se restringen a Quiñónes-Mateu *et al.* (1994), Rossi *et al.* (1999, 2008), Finol *et al.* (2001) y Tejero *et al.* (2009a, 2009b, 2010).

Estudios de cambios musculares en caballos silvestres infectados naturalmente con *T. evansi* realizados por Quiñónes-Mateu *et al.* (1994.), indicaron que el patrón ultraestructural de las fibras musculares, es idéntico al descrito para enfermedades autoinmunes como necrosis en fibras y capilares e infiltración de células mononucleares (macrófagos).

Por su parte Rossi *et al.* (1999), en un estudio ultraestructural de las glándulas adrenales de ratones infectados experimentalmente, mostraron distintos grados de alteraciones en las células de la corteza adrenal, modificaciones de la pared capilar, así como importantes lesiones en capilares y células corticales sugiriendo además que las lesiones en la corteza adrenal podrían ser relevantes en la etiopatogénesis de la “derrengadera”.

Finol *et al.* (2001), investigando la ultraestructura del músculo esquelético de ratones infectados experimentalmente, obteniendo resultados muy parecidos a los de Quiñónes-Mateu *et al.* (1994); también describieron atrofia de la fibra muscular, formación de vacuolas autofágicas, picnosis nuclear, necrosis segmentada, degeneración mitocondrial e infiltrados por macrófagos y neutrófilos.

Rossi *et al.* (2008) describieron anomalías ultraestructurales en el hígado de ratones infectados experimentalmente caracterizadas por abundancia de gotas lipídicas, distribución irregular de las partículas de glicógeno, cambios en el nucleoide peroxisomal, presencia de gránulos de lipofucsina, retículo endoplasmático liso hinchado, mitocondrias pleomórficas y desaparición del retículo endoplasmático rugoso.

Tejero *et al.* (2009a) hallaron cambios ultraestructurales en el riñón de ratones infectados

experimentalmente. Describieron incremento del grosor de la membrana basal glomerular, así como del espesor de la membrana basal de los túbulos contorneados proximales, cambios en la colocación y el agrupamiento de las mitocondrias asociadas a la región basal, así como extenso deterioro epitelial y discutieron al respecto del daño glomerular, sugiriendo que las alteraciones submicroscópicas debilitarían la función tubular, contribuyendo mediante un proceso nefrítico al desarrollo de una falla renal aguda que culminaría con la muerte del hospedador experimental.

Tejero *et al.* (2009b) realizaron infecciones experimentales con *T. evansi* y estudiaron la ultraestructura hepática en murinos, revelándose cambios en las dimensiones de las mitocondrias y las gotas lipídicas, así como alteraciones en otros organelos de los hepatocitos. Igualmente, demuestran modificaciones en el citoplasma de la célula endotelial del sinusoides y de las fenestras. El análisis cuantitativo de las observaciones cualitativas proporciona significancia estadística a los cambios descritos. La presencia de tripomastigotes en los sinusoides, conjuntamente con gotas lipídicas provenientes de hepatocitos, así como los cambios observados sugerirían al hígado como blanco críptico en el ciclo de vida de *T. evansi*.

Tejero *et al.* (2010) demostraron modificaciones ultraestructurales en el miocardio de ratones infectados experimentalmente que se resumen con alteraciones tiempo-dependientes en el número y dimensionalidad mitocondrial, destrucción miofibrilar, pérdida de miofilamentos y atrofia. Además, reseñaron daño en el endotelio vascular incluyendo proyecciones anómalas y presencia de caveolas.

El estudio de los procesos de muerte celular se ha centrado en *T. brucei* (Figuerella *et al.*, 2006), *T. cruzi* (Ameisen *et al.*, 1995) y *L. amazonensis* (Moreira *et al.*, 1995) describiéndose características ultraestructurales y bioquímicas comunes que se han relacionado con procesos apoptóticos.

Duszenko *et al.* (2006), enfatizan que, a pesar de que la idea de pensar que un organismo unicelular que pase por MCP sea contraintuitiva, bacterias y protozoarios (especialmente

los parásitos) no necesariamente deben ser considerados como individuos autosuficientes. Investigaciones de ciertas infecciones bacterianas han llevado al concepto de que estos pueden comportarse como una comunidad formando diferentes poblaciones que obedecen a un quórum “sensing” (Fuqua y Greenberg, 2002) para hacer frente a demandas ambientales. Además se ha demostrado que protozoarios pueden organizarse en poblaciones y establecer comunicación intercelular (Palkova, 1997). De este modo en la última década ha habido un número creciente de reportes que proveen evidencia de apoptosis en bacterias (Lewis, 2000) y protozoarios (Ameisen *et al.* 1995; Welburn *et al.* 1996 y Ameisen *et al.* 2002)

En el 2007 Soeiro y De Souza, reportan procesos de MCP-1 (apoptosis-like) en Trypanosomatídeos mostrando características morfológicas y bioquímicas comunes, como lo son la disminución del potencial de membrana de la mitocondria ($\Delta\Psi_{MM}$), retracción celular, fragmentación de ADN, condensación de la cromatina, segmentación del núcleo entre los mas relevantes. Además establece tratamientos generales con los que se induce MCP-1 como peróxido de hidrogeno, choque térmico, exposición a Oxido Nítrico, agentes quimioterapéuticos y por incremento de la densidad de parásitos.

Debrabant y Nakhari (2003), establecen que la MCP puede representar dos puntos esenciales en estos organismos: (1) Equilibrio en la relación parásito-hospedador por regulación del tamaño de las poblaciones de parásitos, cuando hay insuficiencia de nutrientes o para evitar muerte del hospedador por gran número de parásitos, siendo esto un comportamiento altruístico donde las células menos competentes mueren mientras las más exitosas persisten para ser transmitidas a un siguiente hospedador (2) Como mecanismo de evasión que contribuye a una regulación baja de la repuesta inmune del hospedador, evitando una respuesta inflamatoria masiva y una favorecida dispersión silenciosa del parásito.

Ameisen *et al.* (1995) observaron autorregulación *in vitro* en el crecimiento de *T. cruzi*. Los epimastigotes proliferantes fueron eliminados masivamente, mas no los diferenciadores, permaneciendo así, viables los tripomastigotes. En términos morfológicos, los epimastigotes multiplicantes aparecieron como células esféricas con largo flagelo que,

además, mostraron patrones citoplasmáticos y nucleares que sugieren apoptosis.

De Souza *et al.* en el 2010 reportaron en estudios “in vivo” e “in vitro” características de MCP-1 en formas intracelulares de *T. cruzi* cargadas en células del corazón del hospedador. A partir de éstas determinaron fragmentación del ADN del núcleo y del citoplasma y decremento en el potencial de membrana de la mitocondria a partir de microscopía de fluorescencia. Para ello utilizaron la técnica de TUNEL y la de DiOC₆, el primero fue utilizado usando un kit de detección de apoptosis permitiendo detectar fragmentación del ADN; el otro marcador apoptótico permitió la discriminación de pequeñas variaciones en el potencial de membrana de la mitocondria.

Moreira *et al.* (1995) mostraron que la muerte de los promastigotes de *L. amazonensis* está modulada por iones de Ca⁺⁺ ya que promastigotes sometidos a choque térmico mostraron incrementos significativos (hasta cuatro veces más) en la concentración del ión. Además, encontraron patrones de fragmentación del ADN y características morfológicas que sugieren MCP.

Figuerella *et al.* (2006) realizaron estudios de microscopía electrónica mostrando en eventos de MCP fragmentación nuclear con condensación de la cromatina, mitocondria inflamada, incremento de estructuras lisosomales y paquete flagelar dilatado incluyendo la presencia de dos o más flagelos.

OBJETIVOS

Objetivo General

- Evaluar los cambios ultraestructurales y moleculares de un aislado venezolano de *T. evansi* durante el proceso de muerte celular.

Objetivos Específicos

- Describir el comportamiento de las poblaciones de *T. evansi in vitro* y en infecciones experimentales de los aislados “El Mantecal” y “Teva1”.
- Estudiar la morfometría de los tripomastigotes durante el proceso de muerte celular inducida por altas densidades poblacionales y por bisfosfonatos *in vitro* e *in vivo* de los aislados “El Mantecal” y “Teva1”.
- Describir los cambios ultraestructurales de los tripomastigotes durante el proceso de muerte celular inducida por altas densidades poblacionales y por bisfosfonatos, *in vitro* e *in vivo* de los aislados “El Mantecal” y “Teva1”.
- Comparar la integridad del ADN genómico durante el proceso muerte celular inducida por altas densidades poblacionales y por bisfosfonatos, *in vitro* e *in vitro* de los aislados “El Mantecal” y “Teva1”.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material Biológico

Aislado “El Mantecal” de *T. evansi* derivado de *Equus caballus* y el aislado “Teva1” derivado igualmente de *Equus caballus*. La muestra originaria fue obtenida de un caballo infectado en forma natural en el Hato Terecay, Estado Guárico (8° 02' 58.28" N, 67° 32' 58.72" O, 50 m sobre el nivel del mar). Sangre de la vena yugular del caballo infectado se inoculó inmediatamente en ratones (NMRI ♀). Una vez en el laboratorio, los ratones se sangraron por punción cardíaca y la sangre obtenida se resuspendió (1:1) en dimetil sulfóxido (DMSO) al 10%, preparado en buffer fosfato salino glucosado (0,85% NaCl + 1% glucosa). Acto seguido las muestras fueron criopreservadas en N₂ líquido a -170°C hasta el uso.

Los ratones seleccionados para los experimentos fueron *Mus musculus* (♀) de la cepa NMRI (bioterio IVIC) de 18-20 gr de peso corporal. Estudios preliminares (Perrone *et al.*, 2006) indican que esta cepa es idónea para el estudio del comportamiento parasitológico, inmunológico y morfométrico de *T. evansi*.

Infecciones experimentales

Las muestras, permanecieron en N₂ líquido desde su aislamiento. Los hemoflagelados, una vez descongelados, fueron inoculados en ratas (Sprague-Dawley, ♀, 100 gr) para potenciar su crecimiento.

Una vez alcanzadas parasitemias de 10⁴, las ratas se desangraron por punción cardíaca y la sangre colectada se mezcló con EDTA. A partir de los tripanosomas en anticoagulante se preparó una suspensión de parásitos en buffer fosfato glucosado que, tras diluirse con buffer fresco, proporcionó el material infectante: 10 tripanosoma/gr de peso ratón (Tejero *et al.*, 2008).

Los animales permanecieron en jaulas provistas de agua y alimento *ad libitum*.

Los animales a tratar con bifosfonados se inocularon i.p. con 10 mg/Kg (Urbina *et al.* 1999) por peso corporal diariamente por 7 días; la primera dosis se administró 1 día post-infección.

Experimentos *in vitro*

Los cultivos *in vitro* de *T. evansi* se llevaron a cabo a partir del protocolo descrito por Baltz *et al.* (1985).

El medio de cultivo fue una modificación de medio mínimo esencial (MEM) a base de buffer Hepes y sales de Earle complementado con aminoácidos no esenciales (5,95 g), glucosa (1 g), bicarbonato de sodio (2.2 g), 0,2 mM 2-mercaptoetanol, 2 mM piruvato sódico, 0.1 mM hipoxantina, 2 mM de L-glutamina, 100 U/ml penicilina y 100 µg/ml estreptomina en agua bidestilada y 15% de suero bovino. La mezcla se esterilizó con presión positiva ($\phi = 0,22 \mu\text{m}$) (pH final = 7,3) (Baltz *et al.* 1995). El medio se almacenó a 4°C hasta su uso.

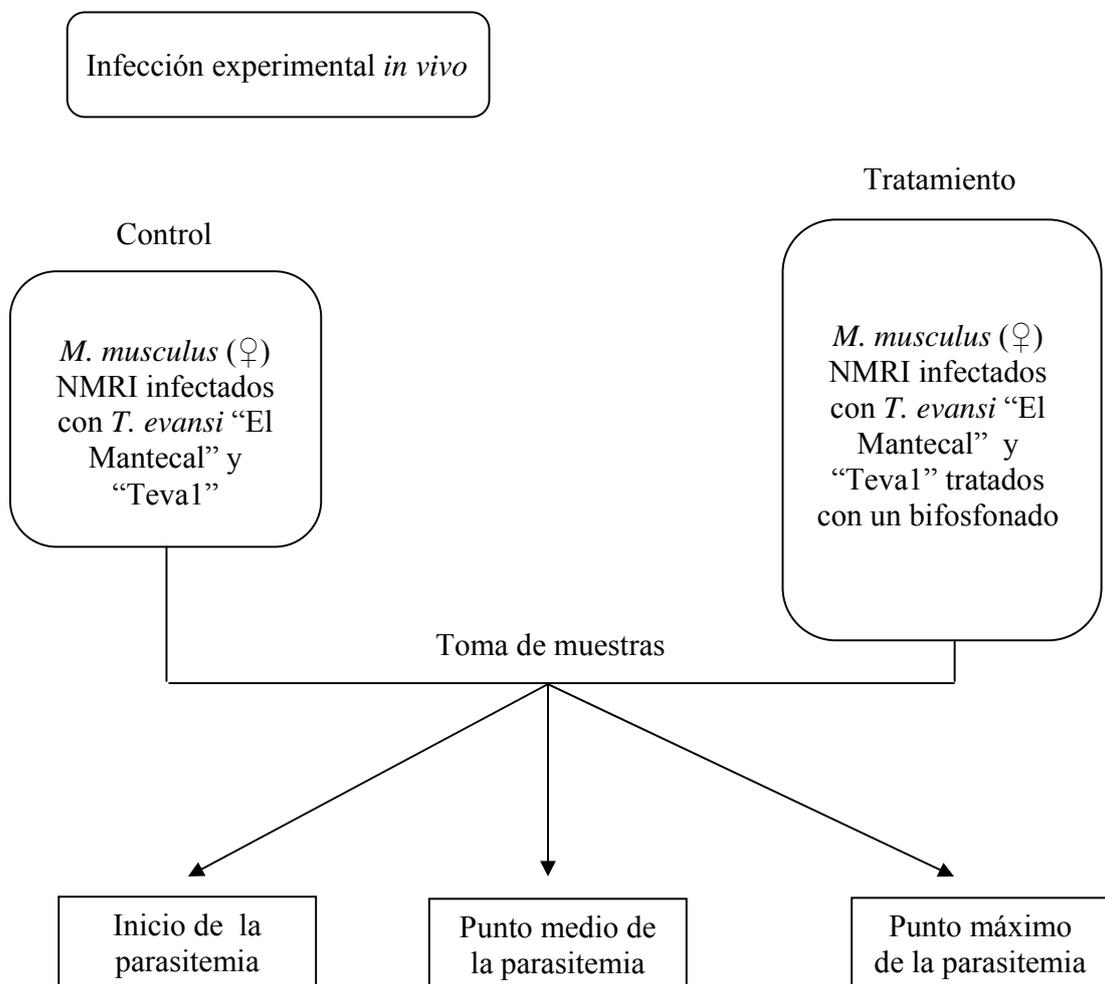
Los tripanosomas crecieron en platos de Petri (37°C; 5% CO₂). 1×10^7 flagelados/ml contenidos en 20 µl del buffer de elución (columna de DEAE-celulosa) se agregaron a 2 ml de medio de cultivo que se incorporó a cada uno de los platos de Petri con 3 ml de medio fresco. Un día después se añadieron 20 µl de un bisfosfonado (Pamidronato) en concentraciones ascendentes de 25 µM, 50 µM, 75 µM y 100 µM (Urbina *et al.* 1999). Se estimó la densidad poblacional a 400X (Brener 1962) cada 24 h hasta completarse las 96 h de cultivo.

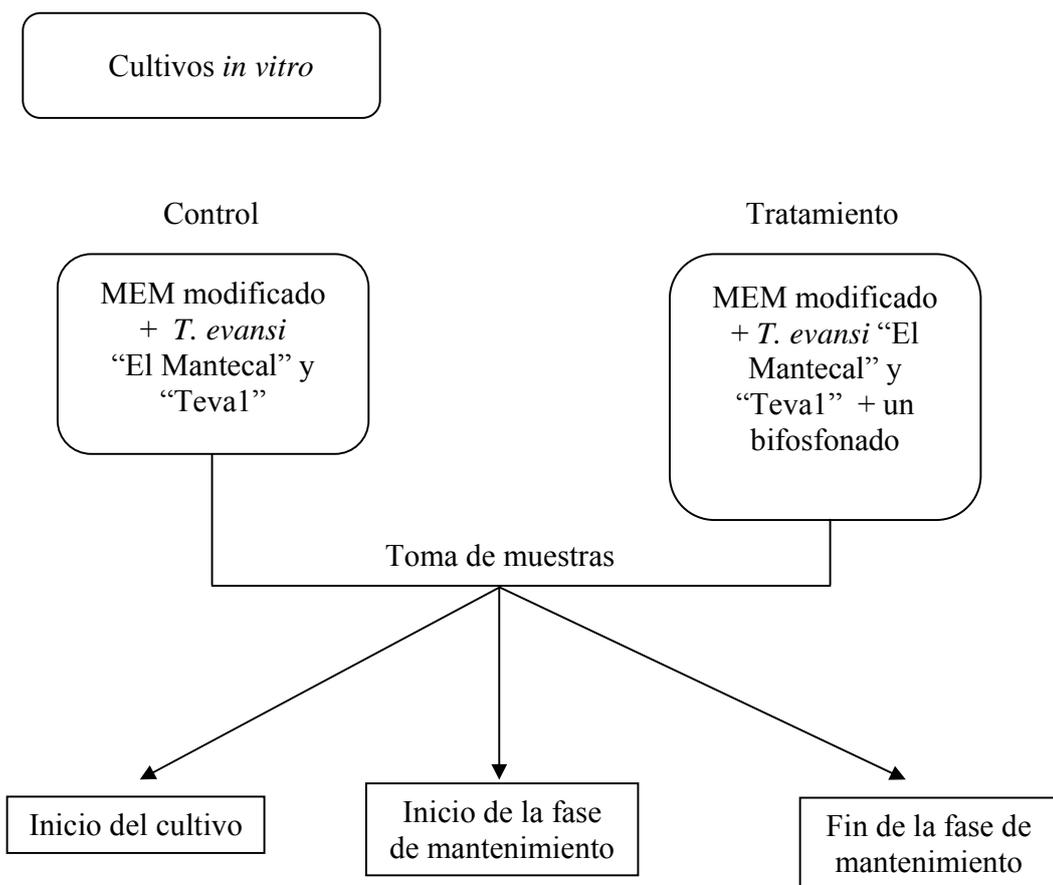
Para probar que las concentraciones de la droga son adecuadas para este cultivo se calculó el IC₅₀. Para ello se realizó una curva de dosis-respuesta, donde la dosis corresponde a las concentraciones de droga utilizada y la respuesta al porcentaje de inhibición de la

parasitemia para cada grupo. Este porcentaje de inhibición se obtuvo a partir de la siguiente fórmula:

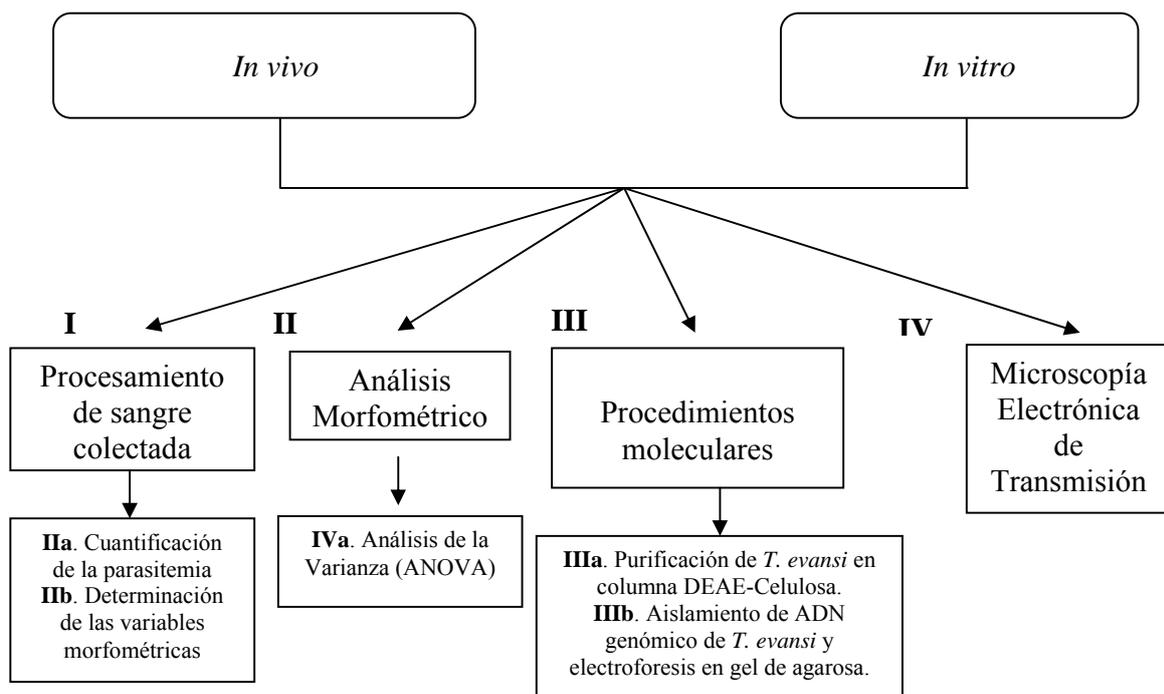
$$PI = \frac{\text{Parasitemia del grupo control} - \text{Parasitemia del grupo tratado}}{\text{Parasitemia del grupo control}} \times 100$$

Diseño experimental





Las muestras obtenidas se procesaron según el siguiente protocolo



Métodos

I. Procesamiento de la sangre colectada.

La sangre se extrajo a partir de la vena caudal mediante un corte en el extremo de la cola del ratón. La sangre colectada fue utilizada del siguiente modo:

5µl se emplearon para estimar, por conteo en fresco, el número de tripanosomas/ml de sangre (Brener, 1962).

5 µl fueron utilizados para hacer los extendidos de sangre que, tras ser fijados con metanol y coloreados con solución de Giemsa al 10%, permitieron registrar las variables morfológicas.

A continuación se detallan los procedimientos que describen las determinaciones indicadas:

Ia. Cuantificación de la parasitemia.

El método usado para la cuantificación de parásitos, es una adaptación del método original de Brener (1962), en el cual se colocan 5 µl de sangre en un porta-objetos, sobre la muestra de sangre se dispone una laminilla cubre-objetos (22mm × 22mm) y se presiona suavemente para que la muestra se distribuya de forma homogénea bajo la superficie del cubre-objetos. La muestra se lleva al microscopio y siguiendo un patrón de avance sistemático se cuentan todos los tripanosomas contenidos en 100 campos a 400X.

La fórmula que permite la evaluación de la parasitemia es la siguiente:

$$\frac{\text{Flagelados}}{\text{ml}} = Oc \times Fm \times Fd$$

donde O_c , representa el número de organismos contados, F_m , es el factor del microscopio y F_d , es el factor de dilución.

F_m , es un valor constante que, por depender de las propiedades de fabricación de la óptica del instrumento utilizado, es diferente para cada microscopio. Para calcularlo, las magnitudes correspondientes a las áreas del cubreobjetos y de un campo microscópico (400X) se dividen. Considerando que el método original fue diseñado para 5mm y que se utilizaron 5 μ l, el valor proveniente del cociente de las áreas se divide entre 0,05 y para que el resultado final se exprese en ml, el cociente obtenido se divide entre 10.

Ib. Determinación de las variables morfométricas.

Se tomaron 5 μ l de sangre y se mezcló con 2 μ l de solución fijadora (Karnovsky), se dejó actuar por 5 min evitando la deshidratación. Se realizaron extendidos que se procesaron de acuerdo al siguiente protocolo:

Post-fijar con metanol absoluto (20 μ l, 5 min).

Secar al aire.

Sumergir en etanol 70% dos veces.

Cubrir con etanol 70% limpio (1min).

Cubrir con May-Grunwald (0,25% en metanol, 2min).

Ecurrir el exceso de colorante.

Cubrir con Giemsa (10% en agua corriente, 20min).

Ecurrir el Giemsa.

Sumergir en acetona para eliminar el exceso de Giemsa.

Sumergir en acetona.

Cubrir con acetona-xilol (2:1) (5min).

Cubrir con acetona-xilol (1:1) (5min).

Cubrir con xilol (5min).

Ecurrir y secar al aire.

Los extendidos se observaron a 1000X en un microscopio provisto de cámara digital y en 10 campos aleatorios se registraron los tripanosoma presentes. Con el programa Scan-Image se determinaron las magnitudes numéricas de las siguientes variables morfométricas: Longitud corporal (LC) y distancia máxima de ancho corporal (A).

II. Microscopía Electrónica de Transmisión (MET)

Cada uno de los grupos experimentales, incluyendo los controles, constaron de seis ratones. Interdiariamente se registró la parasitemia de todos los ejemplares y, de cada grupo, se seleccionó un ratón aleatoriamente al inicio, en el punto medio y al final de la parasitemia. Por punción cardíaca se recolectó la sangre del animal y se purificaron los parásitos que fueron procesados con la técnica del corte fino para MET.

IIa. Fijación

La fijación preserva la ultraestructura biológica y protege la muestra de posibles alteraciones durante los procesos de inclusión, corte, contrastación y observación al microscopio electrónico de transmisión.

Como primer fijador se empleó la solución de Karnovsky, una mezcla de glutaraldehído al 2.5% y formaldehído al 37% en buffer fosfato de Millonig a pH 7,4 y 320 mOsm. Se empleó una osmolaridad mayor que la del plasma de los mamíferos por cuanto en el rango utilizado no se ha observado daño tisular, evitando adicionalmente la dilución excesiva de la solución fijadora que alcanza la región central de la muestra. No se incluye en la osmolaridad total, la contribución del glutaraldehído debido a que no constituye factor importante en la presión osmótica efectiva (Arborgh *et al.*, 1976).

El glutaraldehído es un dialdehído de 5 átomos de carbono con una estructura relativamente sencilla y con un peso molecular de 100,12, cuyo máximo atributo como fijador reside en

su capacidad de establecer puentes de entrecruzamiento con proteínas. El glutaraldehído enlaza a los grupos amino de las proteínas, específicamente el grupo aldehído reacciona con el grupo amino de la lisina ubicada en proteínas adyacentes originando el entrecruzamiento (Bozzola & Russell, 1992).

Una vez extraídas las muestras sangre, se realizaron dos centrifugaciones de 15 min cada una ($3000\times g$) eliminando el sobrenadante y dejando el sedimento para su fijación por 5 min. La fijación prosigue en frascos de 5 ml por 45 min adicionales. Al cabo de ese tiempo, las muestras se lavaron en buffer fosfato por 5 min y se postfijaron en tetróxido de osmio (OsO_4) al 1% en el mismo buffer, bajo las mismas condiciones de osmolaridad y pH. La postfijación se prolongó por 1 hora y se prosiguió con un lavado en agua destilada por 15 min.

El OsO_4 tiene un peso molecular de 254,2 y reacciona primariamente con moléculas lipídicas. Se ha propuesto que las insaturaciones de los ácidos grasos son oxidadas por el OsO_4 , el cual a su vez, es reducido a osmio metálico formando un precipitado opaco que añade densidad y contraste al tejido a observar (Bozzola & Russell, 1992). Así, actúa como fijador y contrastante del tejido, aunque este efecto no es tan marcado si se compara con los contrastantes utilizados en la “coloración” de los cortes finos.

IIb. Deshidratación

Durante la deshidratación se busca sustituir el agua intracelular por un líquido que actúa a modo de solvente entre el medio celular acuoso y la resina de inclusión (hidrofóbica). El reemplazo del medio acuoso se logra mediante una serie de concentración ascendente del agente deshidratante, etanol en este caso.

El protocolo a emplear es el siguiente:

Etanol al 50% en agua1 cambio (5min)

Etanol al 70% en agua1 cambio (5min)

Etanol al 90% en agua1 cambio (5min)
Etanol al 95% en agua1 cambio (5min)
Etanol al 100%2 cambios (5min/c-u)

Todo el proceso anterior hasta etanol 70% se efectuó a 4°C, la deshidratación con etanol al 70%, se efectuará a 4°C, lo cual maximiza la velocidad de difusión del fijador en el material y evita, los cambios *post-mortem* debidos a la acción de las enzimas lisosomales, los cuales no son activas a esa temperatura. Los pasos posteriores se llevaron a cabo a temperatura ambiente.

Iic. Infiltración

Por lo general, se hace necesario el reemplazo del agente deshidratante por un compuesto intermediario entre el etanol y la resina epóxica que se utilizó en la inclusión, ya que el etanol es poco miscible con el epón. Se empleó el óxido de propileno según el siguiente protocolo:

Oxido de propileno 2 cambios (15min/cambio)
Oxido de propileno-epón (1:1) 1 cambio (30min)

IId. Inclusión

El proceso de inclusión propiamente dicho, consiste en la sustitución de la mezcla resina-óxido de propileno por la mezcla de resina que polimerizará bajo ciertas condiciones. De esta forma se le proporciona al espécimen un soporte físico imprescindible para obtener cortes finos.

Antes de la inclusión, se efectuaron 4 cambios en resina de 30 min cada uno (Luft, 1961).

La resina consta de los siguientes compuestos:

Compuesto	Cantidad
EM bed – 812 (resina epóxica)	9 ml
DDSA (Anhidrato ácido)	6 ml
NMA (Anhidrato ácido)	5 ml
DMP - 30 (acelerador amino).....	0.5 ml

La polimerización se llevó a cabo a 60°C por 48 horas.

Ile. Corte y contraste.

Los cortes se obtuvieron mediante el uso de una cuchilla de diamante en un ultramicrotomo Porter-Blum MT2-B. Las secciones finas (60-90 nm) se contrastaron con acetato de uranilo (Watson, 1958) y citrato de plomo (Reynolds, 1963).

El modo de acción de estos contrastantes no se conoce con exactitud, se acepta que los iones uranilo, interactúan con los grupos fosfato presentes en los ácidos nucleicos, tiñendo así de modo importante. Asimismo, los iones plomo se enlazan a componentes cargados negativamente, tales como los grupos hidroxilo, así como a las áreas en la que previamente se había enlazado el osmio. Los grupos fosfatos también podrían estar implicados en este fenómeno (Bozzola & Russell, 1992).

El acetato de uranilo (PM = 422) se usa en forma de solución acuosa al 3%. La rejilla se coloca por 35 min sobre la superficie de la solución de acetato de uranilo en oscuridad, luego se lava con agua destilada y se deja secar antes de proceder al tratamiento con el siguiente compuesto.

El contraste con citrato de plomo (PM = 1054) se efectúa colocando una gota de la solución sobre un papel “parafilm” en una placa de Petri. Es importante destacar que la placa debe estar completamente anhidra, para lograrlo se le colocan perlitas de NaOH durante los 20 min previos a la introducción de las rejillas. Luego de 15 min en contacto con el

contrastante, los cortes se enjuagan vigorosamente con agua destilada y se dejan secar.

Observación

Los cortes finos se examinaron en el microscopio electrónico de transmisión Jeol JEM-1011 con 80 kV de voltaje de aceleración. El registro permanente se efectuó en negativos de 8,3×10,2 cm (Kodak electron microscope film N° 4489).

III. Análisis molecular.

IIIa. Purificación de *T. evansi* en una columna de intercambio aniónico de dietilaminoetil-celulosa (DEAE-celulosa).

Los parásitos se separaron de los elementos sanguíneos siguiendo el protocolo descrito por Lanham & Godfrey (1970). Para ello, se empleó una columna de intercambio iónico cargada con el polímero DEAE-celulosa. Esta técnica se basa en la interacción eléctrica de la membrana celular con la superficie cargada de una resina de DEAE-celulosa. La carga diferencial entre eritrocitos y parásitos, puede ser utilizada como un factor discriminante entre ambos. Al hacer pasar una mezcla de parásitos y elementos formes a través de una columna cargada con el polímero (pH = 8), los eritrocitos son adsorbidos por la carga de la resina, con lo cual se garantiza que los parásitos eluyan sin interactuar eléctricamente con la columna. El procedimiento se llevó a cabo de la siguiente manera.

Ejemplares de *Rattus rattus* (♀; Sprague-Dawley) fueron infectados con los aislados de *T. evansi* ya indicados. Una vez que las parasitemias alcanzaron niveles superiores a 10^6 , se sangraron por punción cardíaca y el fluido colectado se mezcló con EDTA y buffer fosfato glucosado, posteriormente se centrifugó (3000 rpm/10min). Se retiró la capa que sedimenta por encima de los eritrocitos y se diluyó 1:3 buffer fosfato salino glucosado (NaH₂PO₄/Na₂HPO₄ 60 mM, NaCl 150 mM, pH 8,0, 1% glucosa). Esta suspensión, tras ser lavada dos veces más, se drenó a través de una columna de cromatografía de intercambio iónico.

La cromatografía de intercambio iónico se realizó en una resina de DEAE-Celulosa equilibrada con una solución de fosfato (Mono/Di básico) 200 mM, pH 8,0, lavada con 3 volúmenes de buffer fosfato glucosado. Los tripanosomas obtenidos en el paso anterior son añadidos lentamente sobre la DEAE-celulosa y drenados con buffer fosfato glucosado a través de la columna. En la medida que fluyan, fueron colectados a 4°C y centrifugados (3000×g/10 min; 4°C). El sobrenadante fue descartado y el sedimento (flagelados) se lavó con buffer fosfato glucosado. El sedimento del último lavado se resuspendió en buffer fosfato glucosado (2-3 ml) y se determinó el número de tripanosomas purificados. Los tripanosomas purificados se distribuyeron en fracciones de 6×10^8 parásitos/ml (4mg de proteína total aproximadamente), se centrifugaron (14000×g/1 min) y, una vez descartado el sobrenadante, fueron almacenados a -80°C.

IIIb. Aislamiento de ADN genómico a partir de *T. evansi*.

El ADN genómico fue extraído a partir de un sedimento de 10^9 tripanosomas siguiendo el protocolo de un estuche comercial para aislamiento de ADN genómico que consiste en la lisis de las membranas citoplasmática y nuclear es con detergentes aniónicos, remoción del ARN contaminante con una solución de ARNasa, precipitación de las proteínas por saturación con sales neutras (“salting out”) y precipitación del ADN genómico con isopropanol. Luego del lavado con isopropanol, el ADN se disolvió en 100 µl de agua destilada.

IIIb.1 Electroforesis en geles de agarosa.

El ADN genómico fue separado en geles de agarosa al 0,8 % , en tampón TAE 1X (0,04M Tris/Acetato, 0,01M EDTA) con bromuro de etidio a una concentración final de 0,5 µg/ml. La corrida electroforética se llevó a cabo en una cámara horizontal bajo condiciones de voltaje y tiempo variables según el caso. La visualización del ADN fue realizada a través de un analizador de geles. La imagen del gel fue descargada a un computador acoplado al

IV. Análisis cuantitativo de resultados.

IVa. Análisis de la Varianza (ANOVA).

El ANOVA es un estadístico que se utiliza para comparar si los valores de un conjunto de datos numéricos son significativamente distintos a los valores de otro o más conjuntos de datos. El procedimiento para comparar estos valores está basado en la varianza global observada en los grupos de datos numéricos a comparar. Típicamente, el ANOVA se utiliza para asociar una probabilidad a la conclusión de que la media de un grupo de puntuaciones es distinta de la media de otro grupo de puntuaciones. De esta manera, establece que el ANOVA es un procedimiento estadístico que permite analizar si más de dos grupos difieren significativamente entre sí en cuanto a sus medias y varianza. Mediante la comparación se pretende probar una hipótesis de diferencia entre más de dos grupos (Milton 2001).

El ANOVA permitió analizar la existencia de diferencias significativas en cuanto a comportamiento de las poblaciones de *T. evansi*, morfometría de los tripomastigotes, cambios ultraestructurales e integridad del ADN genómico entre los procesos de muerte celular intrínseca, inducida, *in vitro* e *in vivo*.

RESULTADOS

Los resultados obtenidos en la investigación se presentan agrupados en secciones, que los separan de acuerdo a la metodología que fue empleada para su obtención. Así presentamos cuatro secciones que dividen los resultados en “procesamiento de la sangre colectada”, análisis morfométricos, análisis ultraestructurales y análisis moleculares.

I. Procesamiento de la sangre colectada

Ia. Registro parasitológico. Muestra los resultados de una técnica comúnmente empleada en parasitología para evaluar la carga parasitaria a lo largo de una infección experimental y en los cultivos *In Vitro*, en condiciones de tratamiento con droga y comparándola con los controles. Esto de manera de observar el efecto que dicha droga puede tener en la parasitemia de los grupos tratados; por otro lado, la realización de los cultivos permite evaluar los resultados sin el efecto del sistema inmune del hospedador.

Ib. Extendidos. Visualización al microscopio óptico de los tripomastigotes que conforman las poblaciones parasitarias a lo largo de la infección experimental y en los cultivos *In Vitro*. Esto incluye condiciones de tratamiento con droga e infecciones controles. La observación de los parásitos bajo el tratamiento con droga se realiza de manera de observar cambios en la forma del parásito, además la utilización de los cultivos igualmente permite eliminar la acción que ejerce el sistema inmune sobre los tripomastigotes.

II. Análisis Morfométricos. Las secciones anteriores muestran la cantidad de variables estudiadas en las condiciones especificadas. Tomando en cuenta, a su vez, que en los sistemas biológicos las variables escasamente funcionan aisladas ó sin influenciarse unas con otras, un estudio estadístico permite analizar estos sistemas eficientemente. Las técnicas empleadas en esta sección permiten analizar variables estudiadas en conjunto, así detectar correlaciones y sinergias que llevan a formular modelos teóricos de un posible funcionamiento conjunto del sistema experimental en estudio.

III. Ultraestructura. A lo largo de las infecciones experimentales y en los cultivos *In Vitro*, los tripanosomas experimentan una serie de alteraciones submicroscópicas. Estos cambios subcelulares se analizan secuencialmente entre aquellos grupos tratados con droga y los controles. La ultraestructura de los grupos con droga será evaluado de manera de describir posibles alteraciones submicroscópicas, así mismo los cultivos permiten observar cambios que pudieran no ser tan evidentes por la presión del sistema inmune de los murinos.

IV. Análisis moleculares. Esos análisis consideran propiedades asociadas al ADN del tripanosoma, mostrando y comparando la integridad del ADN genómico de tripanosomas sometidos a tratamientos con drogas y controles de infecciones experimentales y cultivos *In Vitro*. El ADN genómico tratado con droga se analiza de manera de determinar posibles cambios en su integridad como efecto de dicho tratamiento.

I. Procesamiento de la sangre colectada

Ia. Registro parasitológico

In Vivo

En la parasitemia (cantidad de flagelados por mL de sangre) de la infección experimental *In Vivo* con ambos aislados (“El Mantecal” y “Teva1”), se observó que el grupo infección (I-Mantecal y I-Teva1) incrementa continuamente la carga parasitaria hasta la muerte de los animales, tanto en el aislado “El Mantecal” como en el aislado “Teva1”. El primero de estos aislados lleva a una infección en el murino más larga (17 días) que el segundo (7 días), ocasionando que el incremento de la parasitemia en el último sea mayor día tras día (Ver gráfica 1).

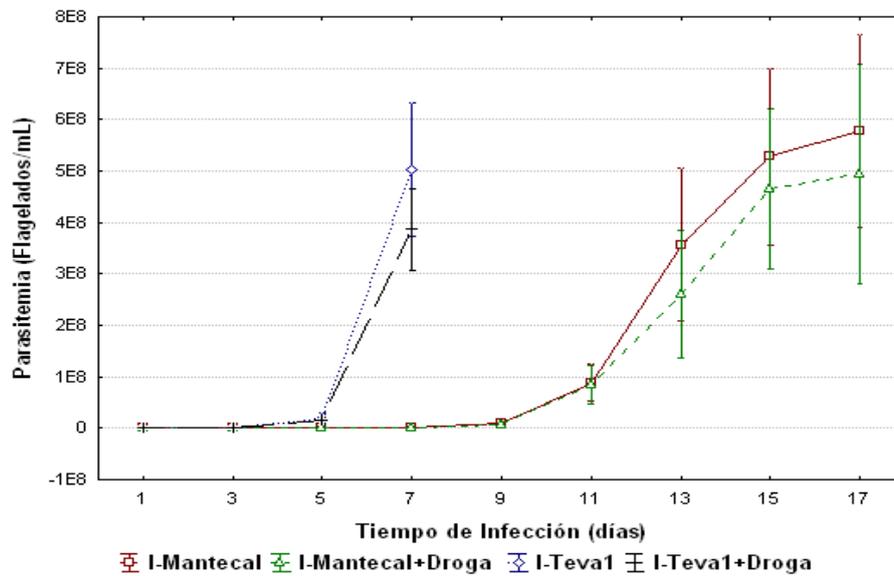
Por su parte el grupo infección más droga (I + D-Mantecal y I + D-Teva1) incrementa de esta misma forma en ambos aislados, pero presentando una carga parasitaria un poco más baja, probablemente por la aplicación de este tripanocida.

In Vitro

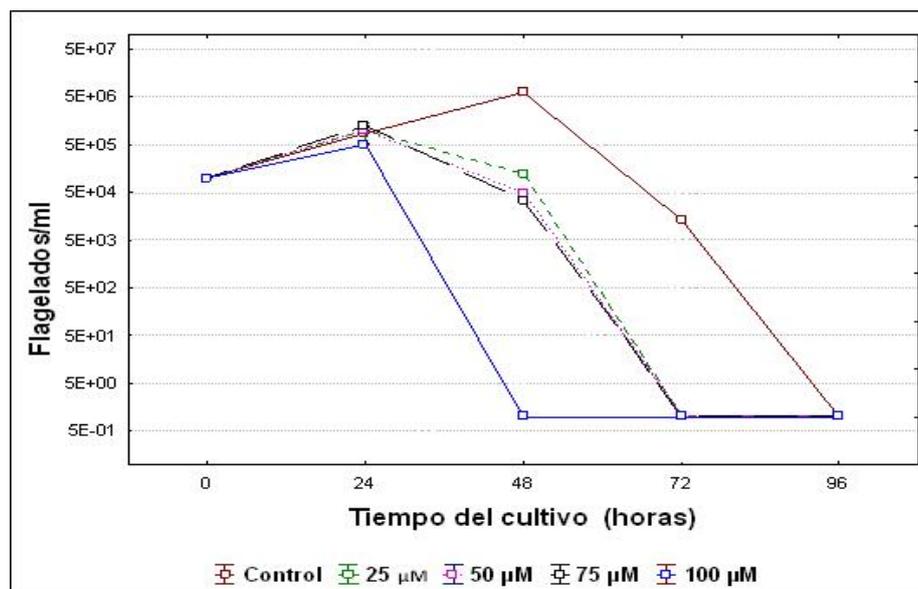
En el caso de los cultivos *In Vitro* se utilizaron dos aislados “El Mantecal” y “Teva1”, sin embargo, el primero de estos no proliferó en el medio modificado que fue utilizado; por cuanto no se pudo realizar el procesamiento de las muestras. En el caso del aislado de “Teva1” el cultivo resultó exitoso y en él podemos observar que el grupo control (sólo infección) creció progresivamente desde el inicio del cultivo hasta las 48 horas, donde comenzó a decrecer hasta las 96h llegando a cero flagelados por mL (Ver figura 2).

Los tratamientos con droga (25, 50, 75 y 100 μ M) empezaron a disminuir la carga parasitaria progresivamente a partir de las 24h hasta llegar a cero en las 72h, las concentraciones más bajas de droga permitieron mayor crecimiento de los tripomastigotes

mientras que la más alta (100 μM) llevaron al cultivo a cero flagelados por mL apenas a las 48h (Ver figura 2).



Grafica 1. La grafica indican en el eje (Y) las variaciones estimadas del promedio de Parasitemia (P) de *T. evansi* de la infección experimental en murinos, en el transcurso del tiempo (eje X). Aquí se muestran los resultados de los grupos de roedores que fueron infectados únicamente con cada aislado y a los que se les dio un tratamiento con Pamidronato. Las líneas muestran el curso y promedio inter diario de P, las barras (ó bigotes) de cada promedio indican el error estándar asociado a cada media aritmética calculo derivado de un Análisis de la Varianza (ANOVA) de 3-Factores, ($\alpha= 0.05$) que se realizó sobre el set de datos. Señalando $P<0.05$ en el efecto de los días (Factor 1). $P<0.05$ en el efecto del aislado (Factor 2) y $P>0.05$ en el efecto de la droga (Factor 3).

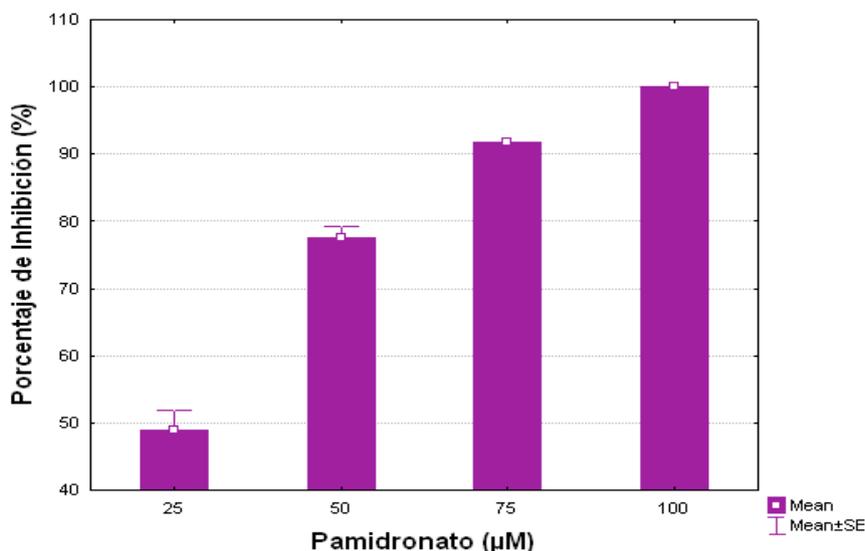


Grafica 2. La gráfica indica en el eje (Y) las variaciones estimadas del promedio de Parasitemia (P) de *T. evansi* de los cultivos *In Vitro*, en el transcurso del tiempo (eje X). Aquí se muestran los resultados de los grupos control (únicamente tripomastigotes) y los grupos que recibieron concentraciones de Pamidronato. Las líneas muestran el curso y promedio inter diario de P, las barras (ó bigotes) de cada promedio indican el error estándar asociado a cada media aritmética calculo derivado de un Análisis de la Varianza (ANOVA) de 2-Factores, ($\alpha= 0.05$) que se realizó sobre el set de datos. Señalando $P<0.05$ en el efecto de las horas de cultivo (Factor 1). $P<0.05$ y $P<0.05$ en el efecto de la droga (Factor 2).

A la hora de realizar el cultivo a los grupos tratados se les añadió una serie de concentraciones ascendentes de la droga. Esto se hizo con el propósito de obtener el IC_{50} del Pamidronato para el aislado “Teva1” de *Trypanosoma evansi*.

Para calcular el IC_{50} realizamos una curva de dosis-respuesta; la dosis corresponde a las concentraciones utilizadas de la droga y la respuesta al porcentaje de inhibición de la parasitemia que estas dosis produjeron en cada grupo tratado. El porcentaje de inhibición se obtuvo a partir de una fórmula que involucra la parasitemia del grupo control y la parasitemia de cada grupo tratado.

De acuerdo a la gráfica obtenida determinamos que la dosis necesaria para producir el 50% de la inhibición de la parasitemia fue de 25 μM .



Grafica 2. Representación gráfica del cambio del porcentaje de inhibición como respuesta a la concentración de la droga.

Ib. Extendidos.

En esta sección mostraremos fotos tomadas a los extendidos que se realizaron a lo largo de las infecciones (aislado “El Mantecal” y “Teva1”), y los cultivos *In Vitro* con y sin tratamiento de droga.

Los extendidos además se realizaron en diferentes puntos de parasitemia, el caso de la infección con “El Mantecal” se tomaron a los 5, 11 y 17 días pudiendo visualizar parásitos únicamente en las últimas dos. En el caso de la infección con “Teva1” se tomaron extendidos a 5 y 7 días y finalmente en el cultivo se tomaron únicamente a las 48h. control y tratamiento con droga.

Fotos de extendidos de una infección con el aislado “El Mantecal”

En estas fotos tomadas de extendidos, realizados en una infección con el aislado “El Mantecal”, se pueden observar tripomastigotes en sangre donde se distingue la membrana ondulante, el flagelo, el núcleo en el centro del parásito y hacia el extremo posterior el cinetoplasto. Estas fotos fueron tomadas a los 17 días de infección con y sin tratamiento de Pamidronato.

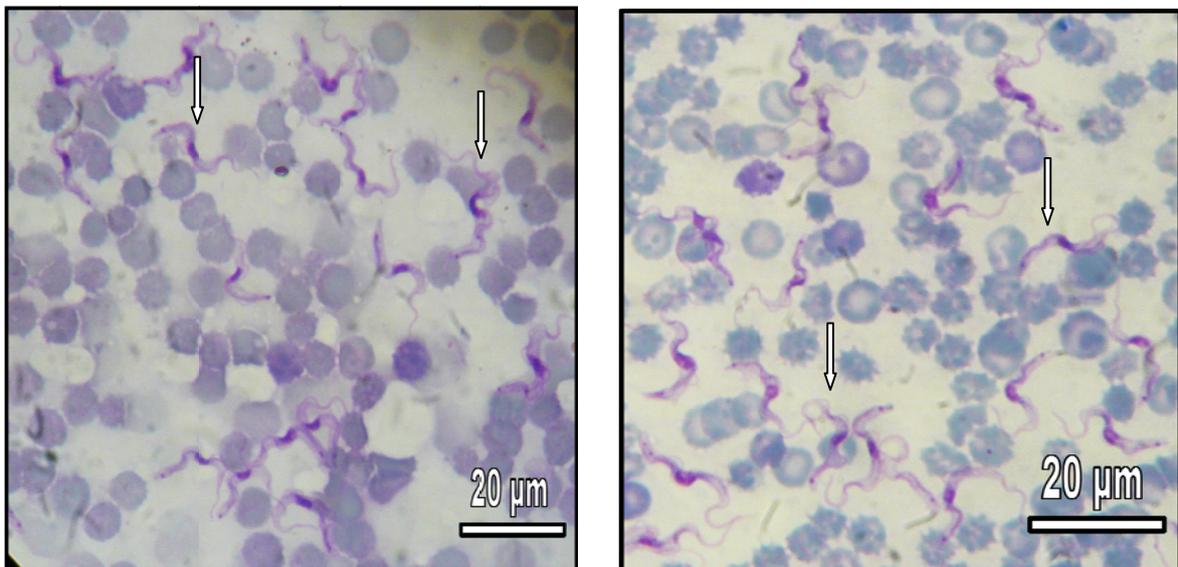


Figura 7. Fotos de dos extendidos tomados a los 17 días de una infección experimental con el aislado “El Mantecal”. El recuadro de la izquierda muestra dos tripomastigotes en sangre donde se observa la membrana

ondulante, el flagelo, el cinetoplasto y el núcleo; el recuadro de la derecha muestra igualmente tripomastigotes en sangre tratados con Pamidronato, pudiendo observar las mismas estructuras.

Fotos de extendidos de una infección con el aislado “Teva1”

Los siguientes extendidos fueron tomados durante una infección con el aislado “Teva1” en un punto alto de parasitemia (7 días post-infección), con y sin tratamiento con Pamidronato. En ellos se puede observar tripomastigotes presentando un núcleo, cinetoplasto, membrana ondulante y flagelo.

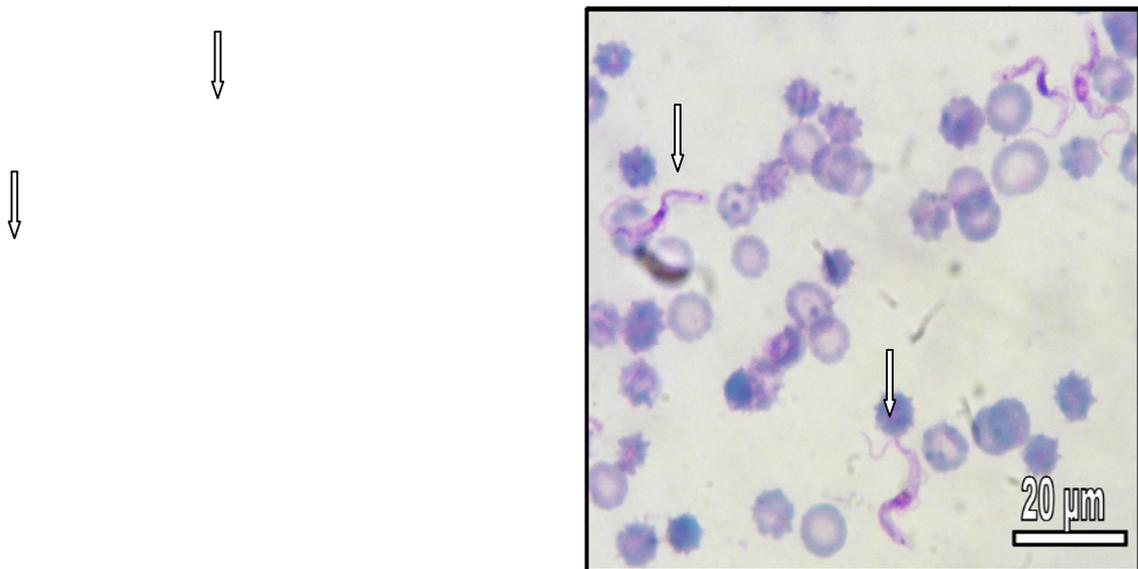


Figura 8. Fotos de dos extendidos tomados a los 17 días de una infección experimental con el aislado “Teva1”. El recuadro de la izquierda muestra tripomastigotes en sangre donde se observa la membrana ondulante, el flagelo, el cinetoplasto y el núcleo; el recuadro de la derecha muestra igualmente tripomastigotes en sangre tratados con Pamidronato, pudiendo observar las mismas estructuras.

Fotos de extendidos de un cultivo *In Vitro* con el aislado “Teva1”

Los siguientes extendidos fueron tomados durante un cultivo *In Vitro* con el aislado “Teva1” a las 48 horas, con y sin tratamiento con Pamidronato a 25, 50 y 75 μM. En ellos

se puede observar tripomastigotes presentando un núcleo, cinetoplasto, membrana ondulante y flagelo.

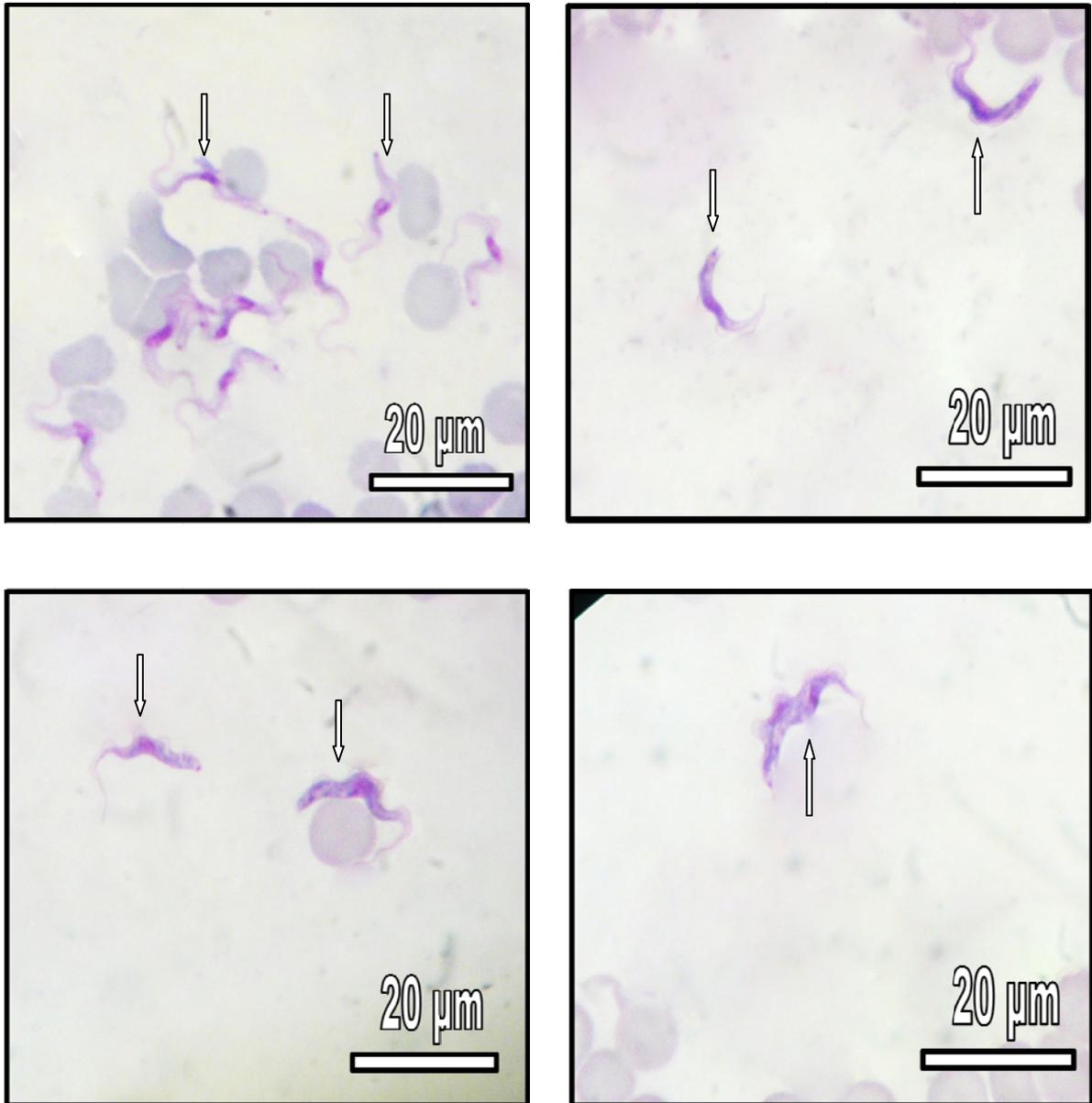


Figura 9. Fotos de cuatro extendidos tomados a las 48 horas de un cultivo *In Vitro* con el aislado “Teva1”. Los recuadro muestra de arriba abajo y de izquierda a derecha, extendidos de grupos control, 25µM, 50 µM y 75 µM de Pamidronato. Se observa la membrana ondulante, el flagelo, el cinetoplasto y el núcleo en todos los extendidos, sin embargo, en el tratamiento con 75 µM no se observa tan claramente la tinción en el núcleo.

II. Análisis Morfométrico.

La siguiente sección pretende cuantificar posibles cambios entre los tripomastigotes de *T. evansi* de dos aislados diferentes, con un tratamiento de droga en infecciones experimentales y cultivos *In Vitro*. Para ello se tomaron medidas de dos características importantes de los flagelados, longitud corporal (LC) y distancia del ancho corporal (A), de los extendidos mostrados en la sección anterior.

IIa. Longitud Corporal (LC)

En las siguientes gráficas se observa que los aislados, en la infección experimental, presentan cambios en el transcurso de la infección, en este caso en la longitud total del tripomastigote. Son evidentes tres cosas, que la tendencia general es al aumento de la longitud corporal, que estos cambios son particulares para cada aislado y que el tratamiento de droga produce una reducción de la magnitud de esta variable respecto a los grupos no tratados en ambos aislados.

En el caso de los cultivos *In Vitro* observamos un patrón de cambio de la longitud corporal en el que primero existe un incremento y al final del cultivo una disminución de la longitud corporal, en el caso de los tratamiento de droga se observa una disminución de la magnitud de esta variable respecto a los no tratados y en relación proporcional a la concentración recibida.

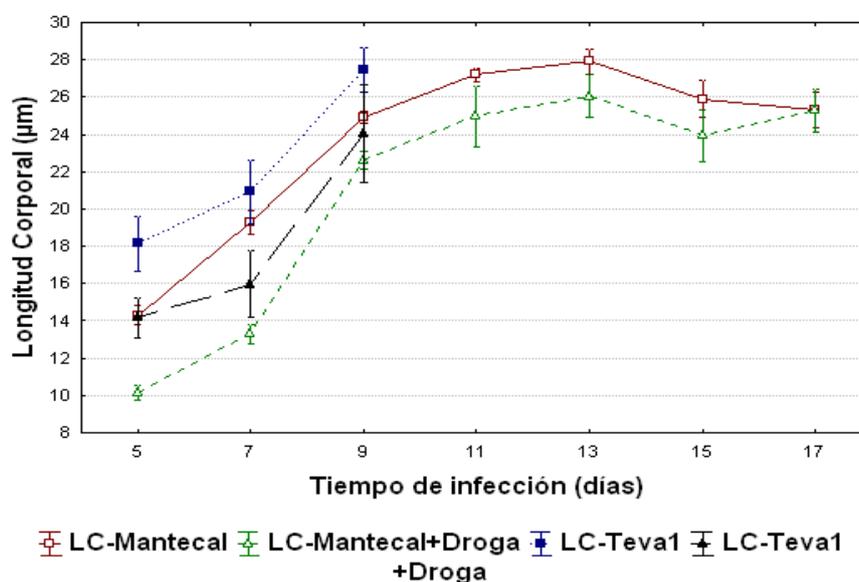
Al observar los análisis de la varianza (ANOVA) de las infecciones experimentales se puede apreciar como existen diferencias significativas ($p < 0.05$) de la longitud corporal (LC) en los tratamiento, los aislado y los días. Sin embargo, al comparar los cambios de la LC entre los tratamientos y los aislados no hay diferencias significativas, al igual que entre los tratamientos y los días, pero sí entre los aislados y los días.

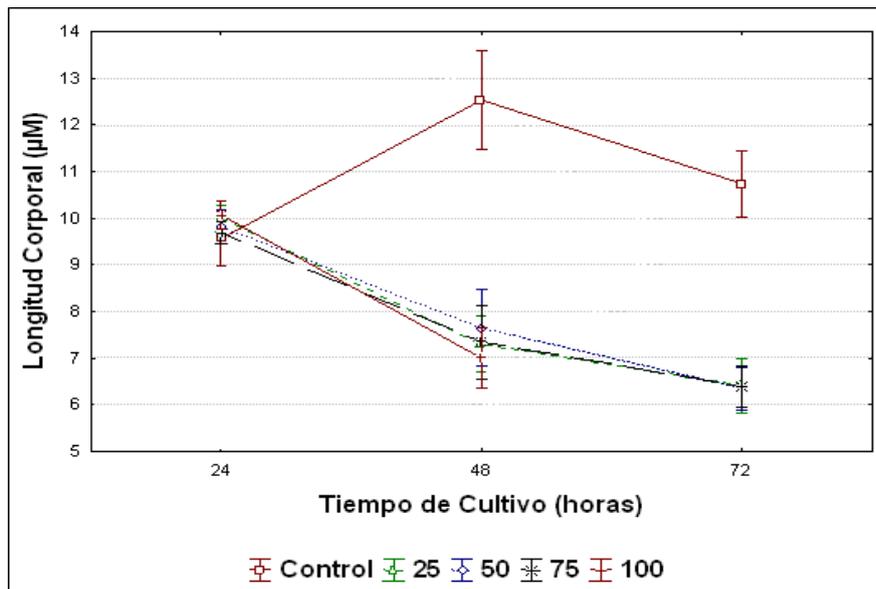
En el caso de los cultivos *In Vitro* la longitud corporal cambia significativamente a lo largo de las horas y los tratamientos; además existen diferencias significativas en esta variable entre las horas y los tratamientos con la droga.

Tabla 2. Resumen de los resultados de ANOVA sobre los valores trazados en el gráfico, arriba los de las infecciones experimentales, abajo los cultivos *In Vitro*.

	Suma de Cuadrados	Grados de Libertad	Cuadrado Medio	F	p
Tratamiento	44,514	1	44,514	73,722	0,000000
Aislados	4,098	1	4,098	6,788	0,009578
Día	66,034	2	33,017	54,681	0,000000
Tratamiento*Aislado	1,369	1	1,369	2,267	0,133077
Tratamiento*Día	0,902	2	0,451	0,747	0,474569
Aislado*Día	10,114	2	5,057	8,375	0,000281
Error	207,712	344	0,604		

	Suma de Cuadrados	Grados de Libertad	Cuadrado Medio	F	p
Hora	63,5603	1	63,56035	13,54991	0,000314
Tratamiento	271,9238	3	90,64126	19,32307	0,000000
Hora*Tratamiento	175,7739	7	25,11055	5,35311	0,000015
Error	778,6780	166	4,69083		





Grafica 4. Representación gráfica del cambio de la longitud corporal a lo largo de la infección experimental (gráfica de arriba) y los cultivos *In Vitro* (gráfica de abajo).

Iib. Distancia de Ancho Corporal (A)

En este caso se observan los cambios en el ancho corporal (A) máximo de los tripomastigotes, y se puede observar que los patrones son similares a las gráficas anteriores. Ambos aislados muestran cambios en esta variable particulares a los patrones de infección de cada uno, además los tratamientos con droga mostraron una disminución en la magnitud del A en relación con los grupos no tratados (comportamiento observado en la variable LC).

Los cultivos *In Vitro* también mostraron patrones similares a los observados para la variable LC. Un cambio en la distancia de ancho corporal fue apreciable en el grupo control que era mayor a cada uno de los grupos tratados con las concentraciones de droga. Dichas concentraciones disminuyeron la distancia de ancho corporal a medida que aumentaban.

Al observar los análisis de la varianza (ANOVA) para las infecciones experimentales se puede apreciar como existen diferencias significativas ($p < 0.05$), de la distancia de ancho corporal en los tratamientos, los aislados y los días. Sin embargo al evaluar los cambios de

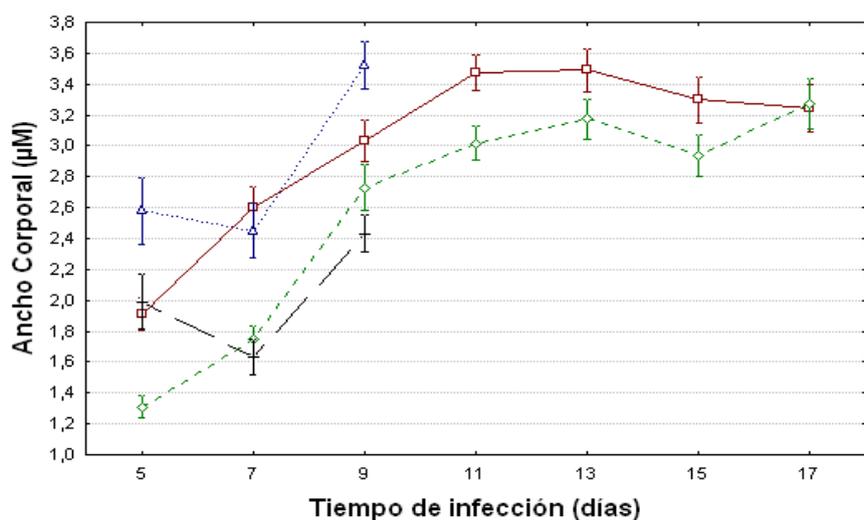
A entre tratamientos y aislados, tratamientos y días y aislados y días no se encontraron diferencias significativas.

En el caso del cultivo *In Vitro* los cambios en A fueron significativos tanto para las horas, los tratamientos como entre estas dos variables.

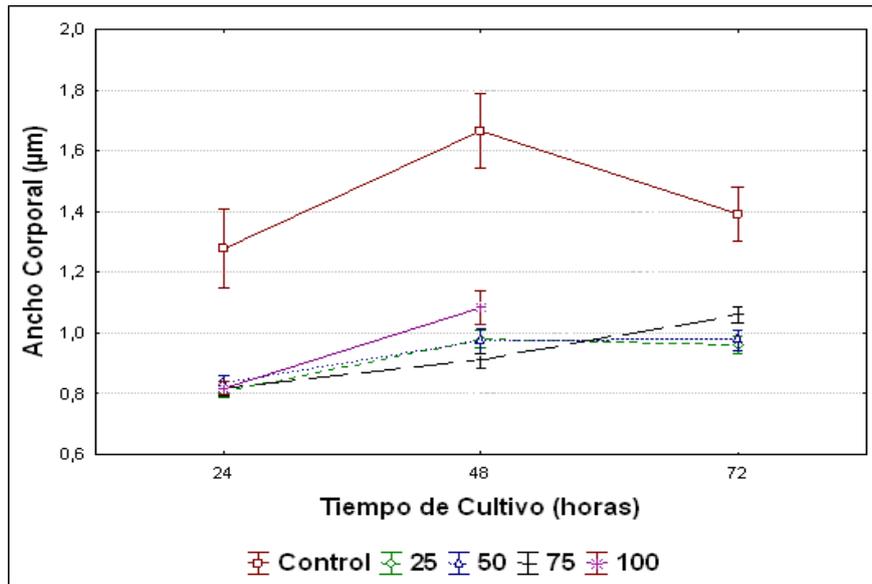
Tabla 3. Resumen de los resultados de ANOVA sobre los valores trazados en el gráfico, arriba los de las infecciones experimentales, abajo los cultivos *In Vitro*.

	Suma de Cuadrados	Grados de Libertad	Cuadrado Medio	F	p
Tratamiento	1515,3	1	1515,3	31,884	0,000000
Aislados	642,0	1	642,0	13,509	0,000275
Día	6987,1	2	3493,5	73,511	0,000000
Tratamiento*Aislado	0,0	1	0,0	0,000	0,992973
Tratamiento*Día	102,6	2	51,3	1,079	0,341067
Aislado*Día	67,6	2	33,8	0,711	0,491882
Error	16348,2	344	47,5		

	Suma de Cuadrados	Grados de Libertad	Cuadrado Medio	F	p
Hora	1,340547	1	1,340547	29,60269	0,000000
Tratamiento	7,850464	3	2,616821	57,78606	0,000000
Hora*Tratamiento	0,684344	7	0,097763	2,15886	0,040348
Error	7,517252	166	0,045285		



■ A-Mantecal
 ■ A-Mantecal+Droga
 ■ A-Teva1
 ■ A-Teva1+Droga



Grafica 5. Representación gráfica del cambio de la distancia de ancho corporal a lo largo de la infección experimental (gráfica de arriba) y los cultivos *In Vitro* (gráfica de abajo).

III. Análisis Ultraestructural.

En esta sección se describen los cambios subcelulares que aparecen en los tripanosomas en infecciones experimentales en murinos y en cultivos celulares *In Vitro*, con los aislados de “El Mantecal” y “Teval”.

El estudio por microscopía electrónica de transmisión examina cambios subcelulares de los tripomastigotes que pueden aparecer durante su estadía en un hospedador, estos cambios permiten establecer patrones de alteraciones que eventualmente lleven a la muerte del parásito. Al comparar estos cambios con los cambios encontrados en los cultivos ó en los tratamientos con droga se puede llegar a diferenciar características en las formas de muerte del parásito. Así mismo al comparar infecciones experimentales entre dos aislado como los antes mencionados, se podrá establecer diferencias entre las características submicroscópicas de muerte de los parásitos.

A continuación presentamos el seguimiento ultraestructural en tres puntos de parasitemia (bajo, medio y alto) de una infección experimental con el aislado “El Mantecal”.

En las micrografías de las figuras 10, 11 Y 12 se observa una serie de alteraciones que se van produciendo a medida que la infección experimental avanza en el murino. A puntos bajos de parasitemia se observan tripomastigotes normales mostrando núcleo, flagelo, bolsillo flagelar, glicosomas y acidocalcisomas en buen estado; en un punto de medio se continúan observando estructura sub celulares de estos parásitos sin alteraciones, con algunas pequeñas extracciones citoplasmáticas.

A un punto alto de parasitemia se pueden observar intensa extracción citoplasmática, pérdida del citoesqueleto del parásito, ruptura membranal y acumulación de la heterocromatina en gránulos, a su vez se puede observar la acción del sistema inmune en la fagocitosis de un tripomastigote por un eosinófilo.

Figura 10: Descripción ultraestructural de tripomastigotes a 5 días de post-infección experimental de murinos NMRI con *Trypanosoma evansi* aislado “El Mantecal”.

Figura 10a. Se observa tres tripomastigotes mostrando múltiples ribosomas (flecha), acidocalcisomas con un cristal de calcio normal (estrella), múltiples flagelos (F) donde se puede apreciar el axonema y posibles glicosomas (círculos).

Figura 10b. Podemos ver un tripomastigote en proceso de división (cabeza de flecha) mostrando un núcleo prominente (N) y su nucléolo (n), además se observan ribosomas (flecha) en el citoplasma y el flagelo (F) característico de estos protozoa.

Figura 10c. Tripomastigotes de *T. evansi* en buen estado mostrando sus núcleos (N), nucléolo (n), algunos acidocalcisomas (estrella) y el flagelo (F).

Figura 10d. Tripomastigote mostrando el núcleo (N), su nucléolo (n), el cinetoplasto (C), el flagelo (F) y la red de microtúbulos sub-peliculares (asterisco).

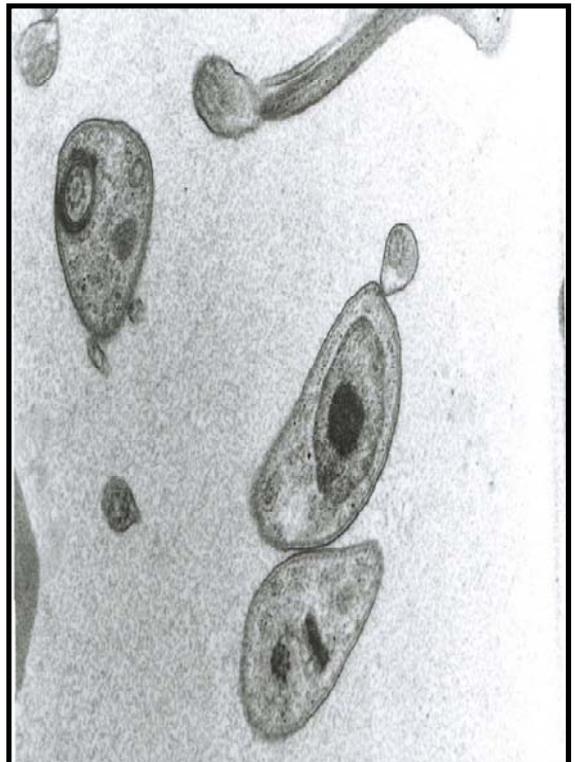
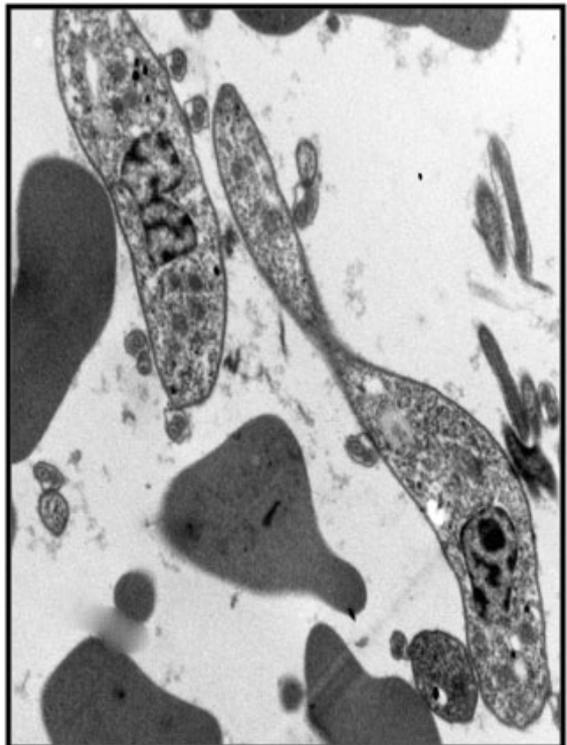
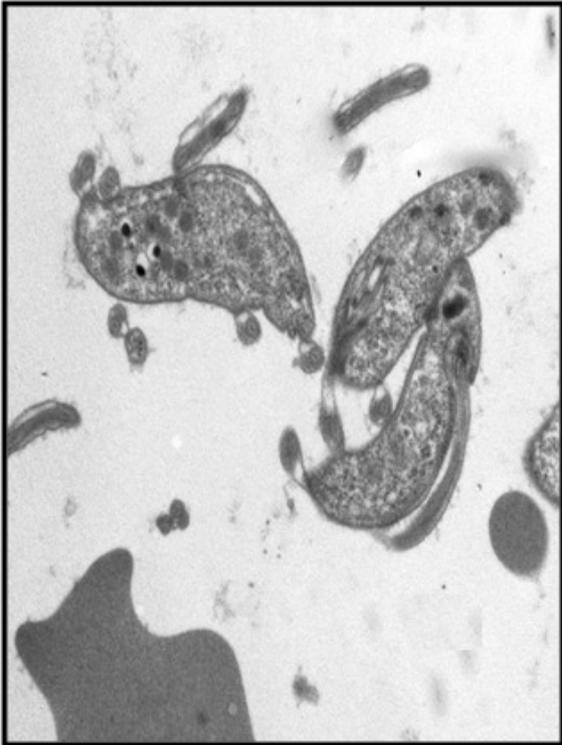


Figura 11: Descripción ultraestructural de tripomastigotes a 11 días de post-infección experimental de murinos NMRI con *Trypanosoma evansi* aislado “El Mantecal”.

Figura 11a. En esta micrografía se observan tripomastigotes que muestran glicosomas (círculos), el flagelo (F) con su bolsillo flagelar (BF), un acidocalcisoma (estrella) y unas pequeñas extracciones citoplasmáticas visualizadas como zonas electrón transparentes (asterisco).

Figura 11b. Se pueden ver tripomastigotes donde uno de ellos muestra un núcleo prominente y alargado (N) con acumulación de heterocromatina y acidocalcisoma con acumulación del cristal de calcio (estrella).

Figura 11c. Tripomastigotes donde se destaca el cinetoplasto (C) en el interior de la mitocondria, el cuerpo basal del flagelo (CB), el bolsillo flagelar (BF) y el flagelo con su su axonema (F) y además se observan múltiples ribosomas en el citoplasma (flecha).

Figura 11d. En esta micrografía se puede observar a una célula del sistema inmune, un natural killer (NK), así mismo observamos tripomastigotes en división en donde se puede apreciar el flagelo (F) y el núcleo (N).

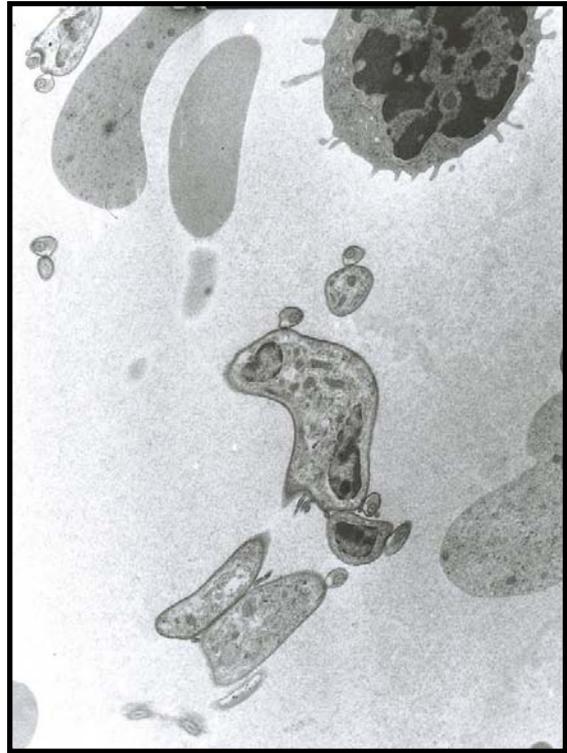
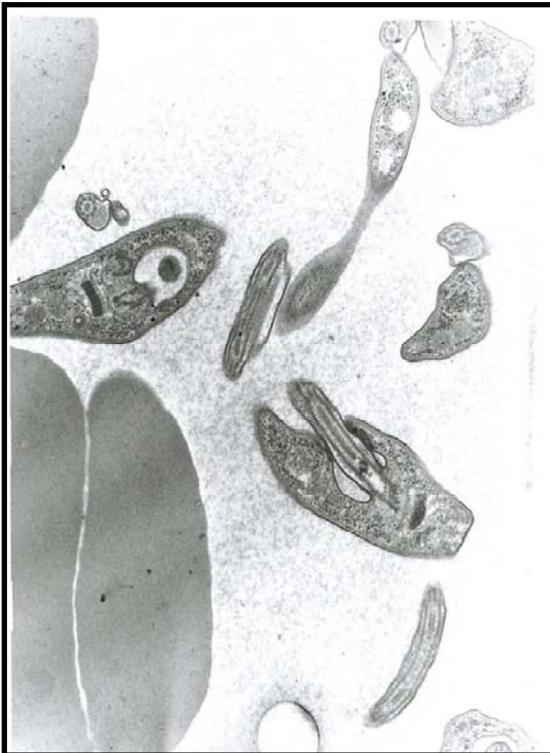
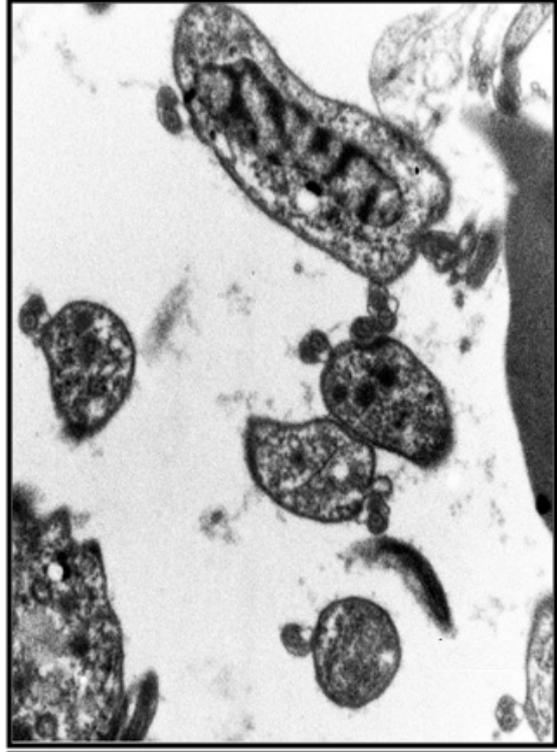


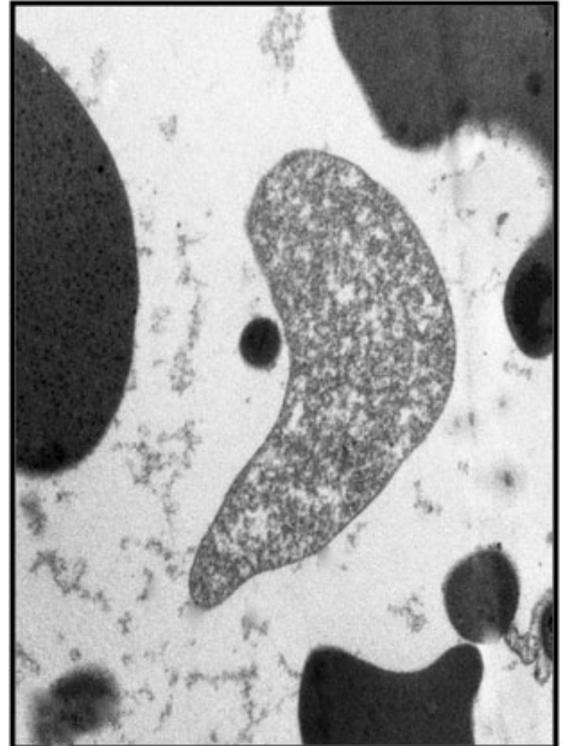
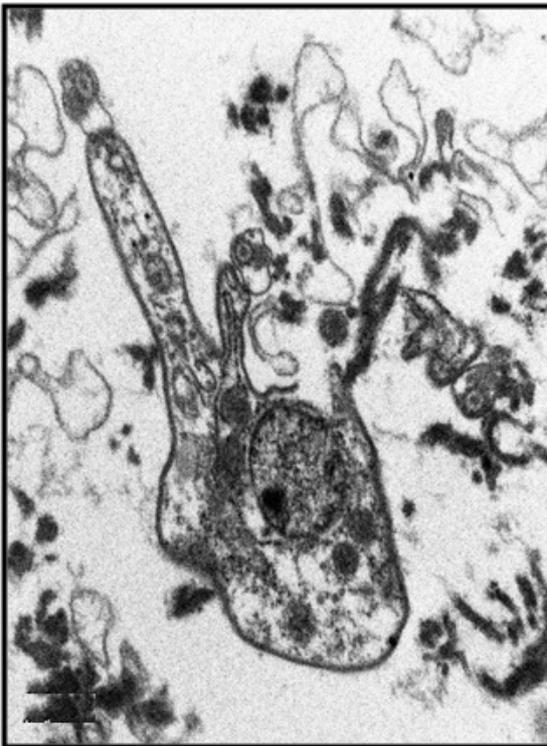
Figura 12: Descripción ultraestructural de tripomastigotes a 17 días de post-infección experimental de murinos NMRI con *Trypanosoma evansi* aislado “El Mantecal”.

Figura 12a. Se observa una célula del sistema inmune, eosinófilo, en posible digestión de un Tripomastigote (Eu), se observa además un flagelo (F) perteneciente a un tripomastigote circundante.

Figura 12b. Tripomastigote mostrando intensa extracción citoplasmática (asteriscos), acumulación de la heterocromatina en grumos (cabeza de flecha) dispuesta en la periferia del núcleo (N) y el cinetoplasto (C) rodeado por la mitocondria (M).

Figura 12c. Esta micrografía muestra un Tripomastigote que presenta una ruptura de la membrana plasmática (cabeza de flecha), pérdida del contenido citoplasmático (asterisco), además se observa el flagelo (F) que se mantiene en un estado normal.

Figura 12d. Tripomastigote que ha perdido el citoesqueleto (cabeza de flecha) así como su contenido organelar (asterisco) y se encuentra en un estado de muerte celular.



A continuación se mostrará el seguimiento ultraestructural, igualmente en tres puntos de parasitemia (bajo, medio y alto) de una infección experimental con el aislado “El Mantecal” y un tratamiento de droga (Pamidronato).

Las micrografías de la infección con tratamiento de Pamidronato (Figuras 13, 14, 15) mostraron una serie de alteraciones que se van produciendo a medida que la infección experimental avanza en el murino. En los puntos bajos y medios de parasitemia se mantuvieron las estructuras normales de los tripomastigotes como el núcleo, el flagelo, los glicosomas y acidocalcisomas, que en algunos casos mostraron una disposición en media luna del cristal de clacio. A un punto alto de parasitemia se pueden observar intensa y media extracción citoplasmática, pérdida del citoesqueleto del parásito, y acumulación de la heterocromatina en grumos además de la disposición persistente del cristal de calcio en media luna.

Seguidamente se mostrará el seguimiento ultraestructural de un cultivo *In Vitro* a las 48 horas con el aislado “El Mantecal” y con tratamientos de un bisfosfonato (Pamidronato) a concentraciones ascendientes (25 μ M, 50 μ M y 75 μ M).

Los cultivos *In Vitro* con tratamiento de Pamidronato (Figuras 16, 17, 18 y 19) ultraestructuralmente mostraron alteraciones a medida que se incrementaba la concentración de la droga. En las micrografías de tratamiento con 25 μ M se empezaron a observar pequeñas extracción del contenido citoplasmático y vacuolización del mismo; a los 50 μ M estas alteraciones se mantuvieron y además se observó engrosamiento de la envoltura nuclear. Finalmente a 75 μ M se observaron tripomastigotes en estado de muerte que habían perdido el citoesqueleto, además de una pérdida más intensificada del contenido citoplasmático.

Figura 13: Descripción ultraestructural de tripomastigotes a 5 días de post-infección experimental de murinos NMRI con *Trypanosoma evansi* aislado “El Mantecal” y un tratamiento de Pamidronato 7,5 mg/Kg.

Figura 13a. Podemos observar dos tripomastigotes mostrando el núcleo (N) en estado normal con su nucléolo (n), además se observa la red de microtúbulos sub-peliculares (asterisco) y el flagelo (F).

Figura 13b. Aquí se observa un tripomastigote en división (cabeza de flecha), el núcleo (N) con su nucléolo (n) ubicado en el centro del nucleoplasma, además se observa un acidocalcisoma con su respectivo cristal de calcio (estrella).

Figura 13c. Otro corte muestra dentro de un tripomastigote posibles glicosomas (círculos), exposición del núcleo (N), nucléolo (n) y concentración normal de la heterocromatina (cabeza de flecha) y además se observa el flagelo (F).

Figura 13d. Este tripomastigote muestra el núcleo (N), y un acidocalcisoma que presenta el cristal de calcio en una forma menos circular (estrella), disposición media luna, y por último el flagelo (F).

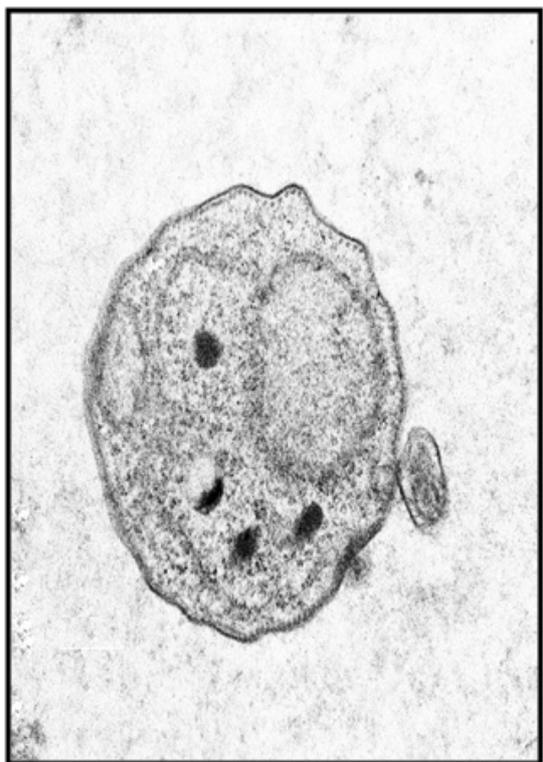
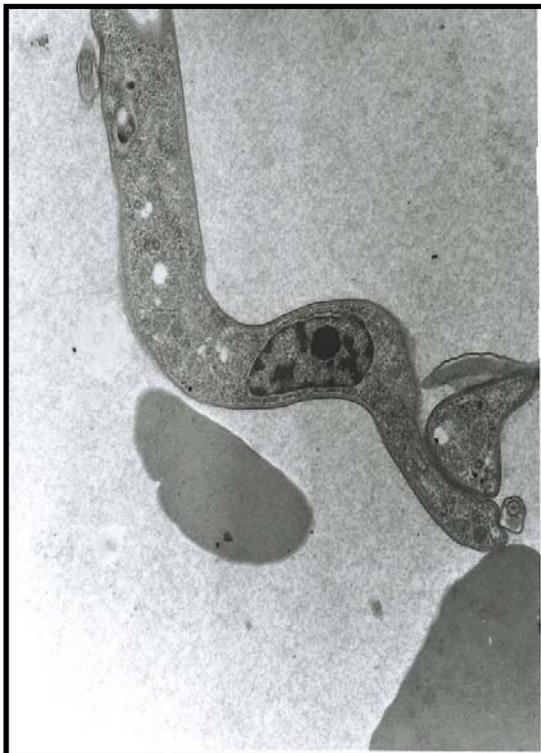
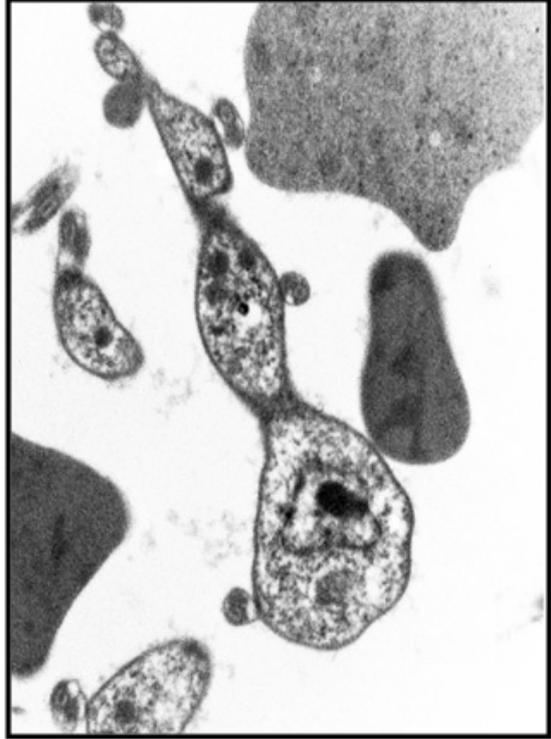
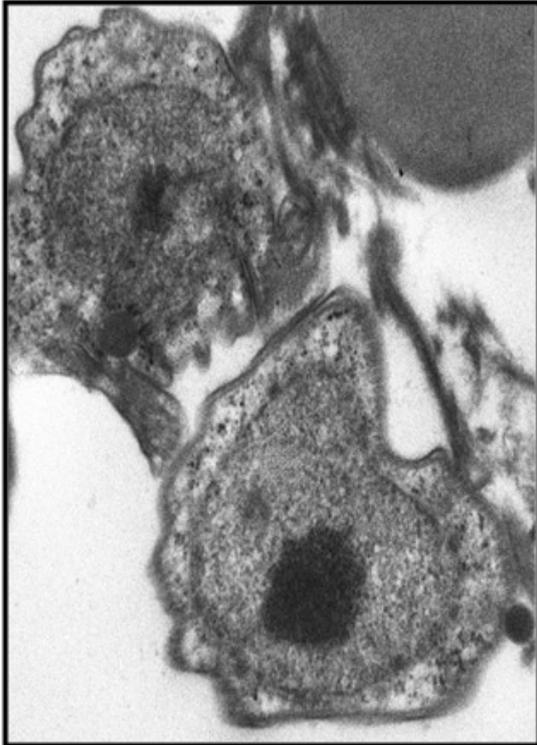


Figura 14: Descripción ultraestructural de tripomastigotes a 11 días de post-infección experimental de murinos NMRI con *Trypanosoma evansi* aislado “El Mantecal” y un tratamiento de Pamidronato 7,5 mg/Kg.

Figura 14a. Se puede observar un tripomastigote con su núcleo (N) mostrando heterocromatina dispuesta periféricamente (cabeza de flecha), abundantes ribosomas en el citoplasma (flecha), un acidocalcisoma (estrella), el bolsillo flagelar (BF) y el flagelo (F).

Figura 14b. En esta micrografía se puede observar la barra flagelar característica del flagelo de los Tripanosomatídeos (flecha), así como un acidocalcisoma con un cristal de calcio (estrella) y su flagelo (F).

Figura 14c. Podemos observar un tripomastigote en el que resaltan los acidocalcisomas con sus cristales de calcio (estrellas), el flagelo mostrando el axonema (F) y el núcleo (N) con heterocromatina dispuesta periféricamente (cabeza de flecha).

Figura 14d. Se puede distinguir con facilidad el núcleo (N), los glicosomas (círculos) y el flagelo mostrando el axonema (F).

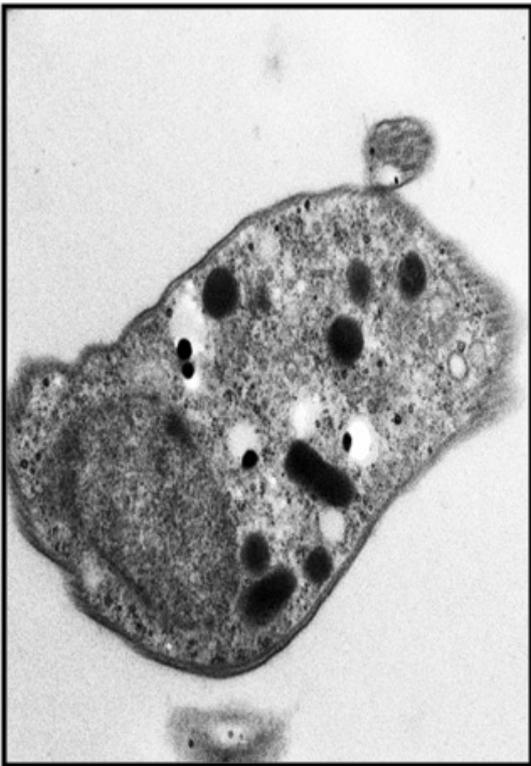
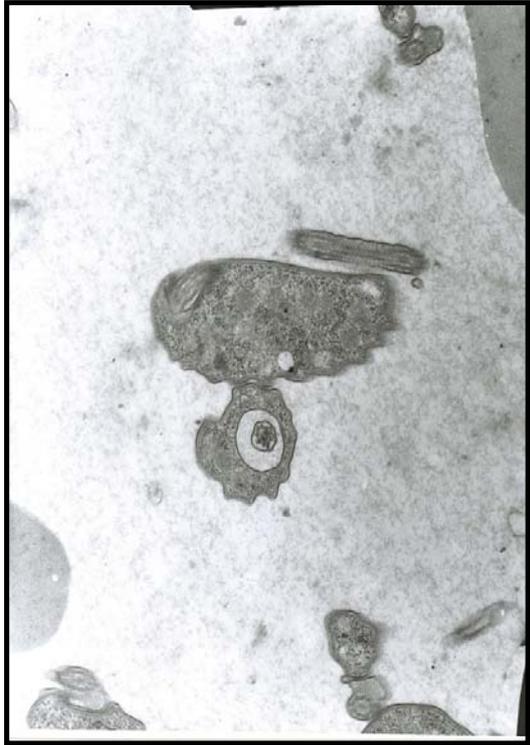


Figura 15: Descripción ultraestructural de tripomastigotes a 17 días de post-infección experimental de murinos NMRI con *Trypanosoma evansi* aislado “El Mantecal” y un tratamiento de Pamidronato 7,5 mg/Kg.

Figura 15a. En esta micrografía podemos observar un tripomastigote con extracciones del contenido citoplasmático (asterisco) que se observan como espacios electrón transparente, así mismo se observa el flagelo (F) y algunos glicosomas (círculos).

Figura 15b. Este tripomastigote muestra zonas de pérdida de contenido citoplasmático (asterisco) además se observan acidocalcisomas con disposición en media luna del cristal de clacio (estrellas) y el flagelo (F).

Figura 15c. Se observan tripomastigotes con una pérdida masiva del contenido citoplasmático (asteriscos) además de una acumulación en grumos de la heterocromatina que está dispuesta en la periferia (cabezas de flecha) y por último el cinetoplasto (C) rodeado por la mitocondria (M).

Figura 15d. Aquí un tripomastigote que ha perdido el citoesqueleto (cabeza de flecha) así como su contenido organelar (asterisco) y se encuentra en un estado de muerte celular.

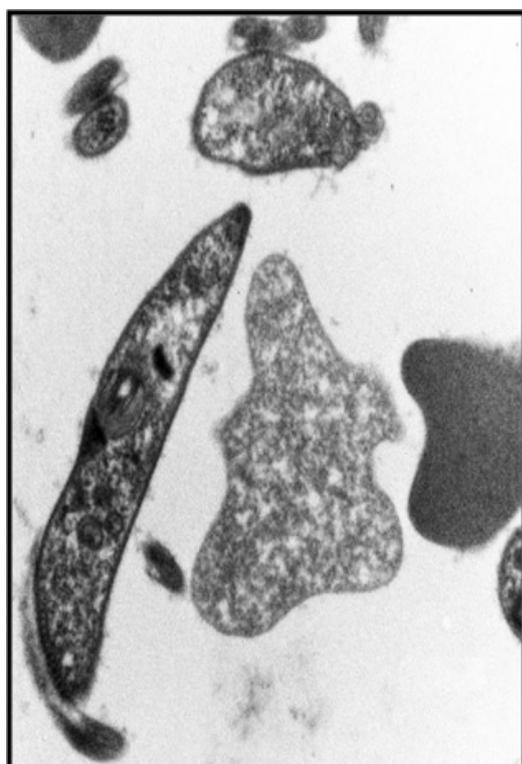
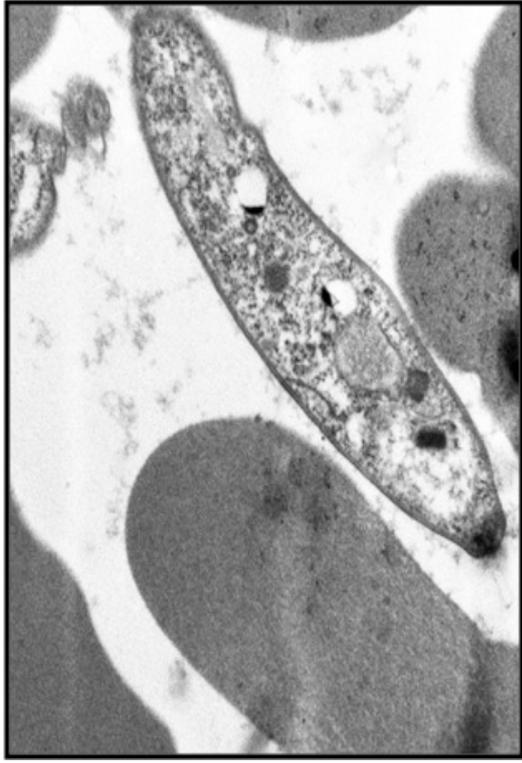


Figura 16: Descripción ultraestructural de tripomastigotes de 48 horas de un cultivo In Vitro con *Trypanosoma evansi* aislado “Teva 1”.

Figura 16a. Se observa un tripomastigote donde se puede ver el cinetoplasto (C) y la mitocondria (M) con su doble membrana, también se ve el flagelo (F), el bolsillo flagelar (BF) y el cuerpo basal del flagelo (CB).

Figura 16b. En esta micrografía se observa el cinetoplasto del parásito (C), así como el flagelo (F) mostrando su axonema y múltiples ribosomas en el citoplasma (flecha).

Figura 16c. Se distingue fácilmente el núcleo (N) con su nucléolo (n), la condensación de la heterocromatina dispuesta periféricamente (cabeza de flecha) y el flagelo (F).

Figura 16d. Aquí el tripomastigote muestra la red de microtúbulos sub-peliculares (asterisco), el núcleo (N) y el nucléolo (n) y el flagelo que evidencia el axonema (F).

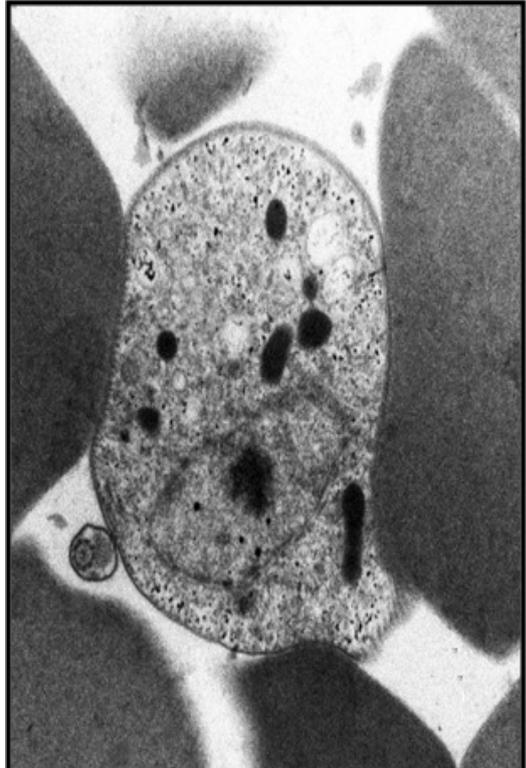
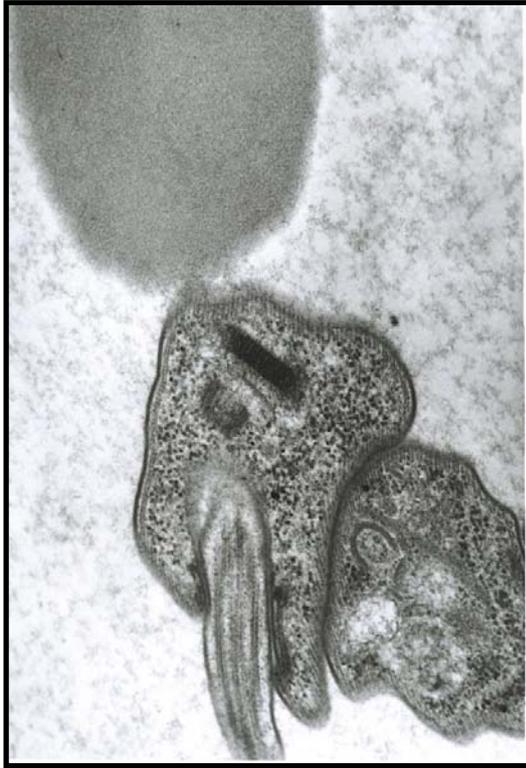


Figura 17: Descripción ultraestructural de tripomastigotes de 48 horas de un cultivo In Vitro con *Trypanosoma evansi* aislado “Teva 1” y un tratamiento de Pamidronato a 25 μ M.

Figura 17a. Se observan eritrocitos (E) y un tripomastigote mostrando el núcleo (N) y su nucléolo, además se observa una pequeña pérdida del contenido del citoplasma (asterisco) y al flagelo (F).

Figura 17b. Este tripomastigote muestra la red de microtúbulos sub-peliculares (cabeza de flecha), algunas vacuolas (V), pequeñas zonas de extracción citoplasmática (asterisco), una acidocalcisoma con su cristal de calcio (estrella) y el flagelo (F).

Figura 17c. Se observa un tripomastigote con su red de microtúbulos sub-peliculares (asterisco), un flagelo (F) y algunos glicosomas (círculos).

Figura 17d. Entre los eritrocitos (E) encontramos un tripomastigote que muestra el núcleo (N), el nucléolo (n), algunas vacuolas en el citoplasma (V) y una zona electrón transparente (asterisco).

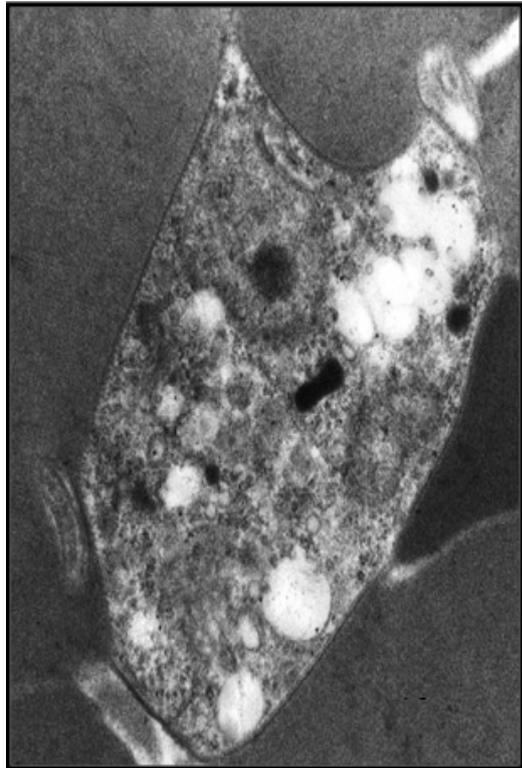
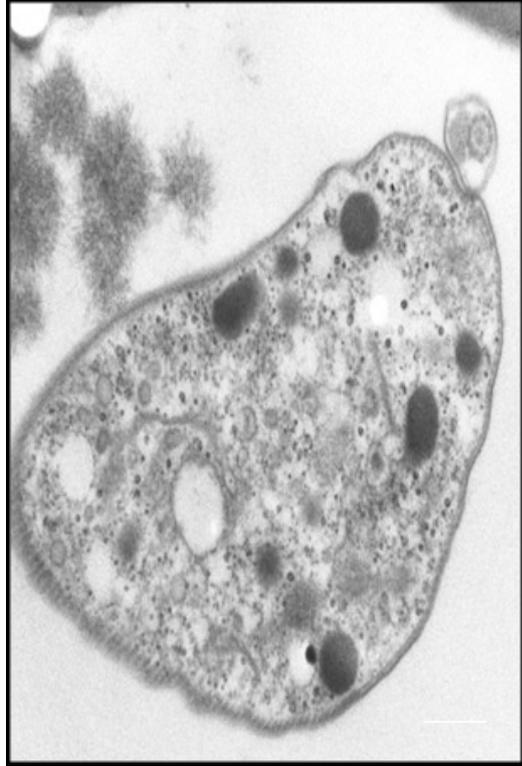


Figura 18: Descripción ultraestructural de tripomastigotes de 48 horas de un cultivo In Vitro con *Trypanosoma evansi* aislado “Teva 1” y un tratamiento de Pamidronato a 50 μ M.

Figura 18a. Tripomastigote mostrando la red de microtúbulos sub-peliculares (asterisco), el núcleo (N), el nucléolo (n) y además un engrosamiento de la envoltura nuclear (cabeza de flecha).

Figura 18b. Se observan tripomastigotes mostrando un acidocalcisoma (estrella), el flagelo (F), pequeñas zonas electrón transparentes (asterisco) y algunos glicosomas (círculos).

Figura 18c. Se puede observar entre los eritrocitos (E) un tripomastigotes con zonas de pérdida del contenido citoplasmático (asterisco), el flagelo (F) y la red de microtúbulos sub-peliculares (cabeza de flecha).

Figura 18d. Tripomastigotes mostrando glicosomas (círculos), el flagelo (F), la red de microtúbulos sub-peliculares (cabeza de flecha) y una región electrón transparente en el citoplasma (asterisco).

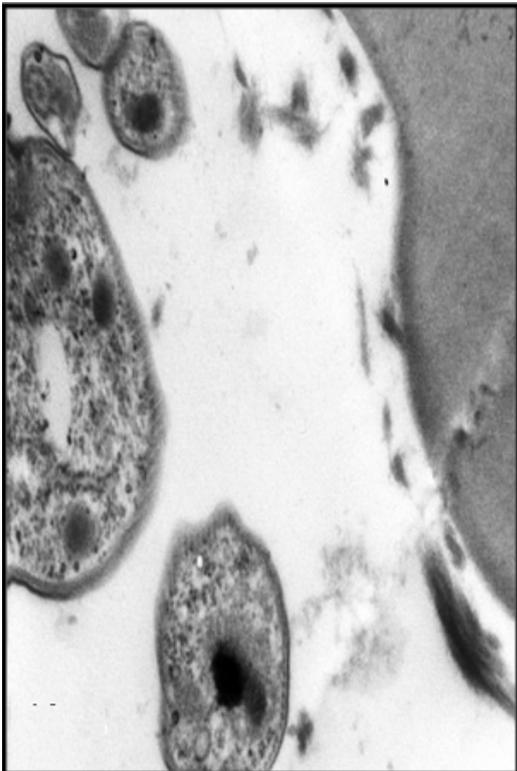
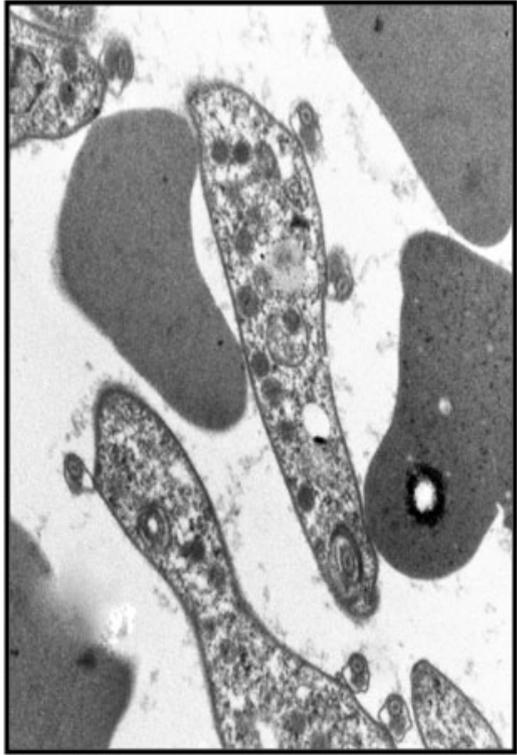
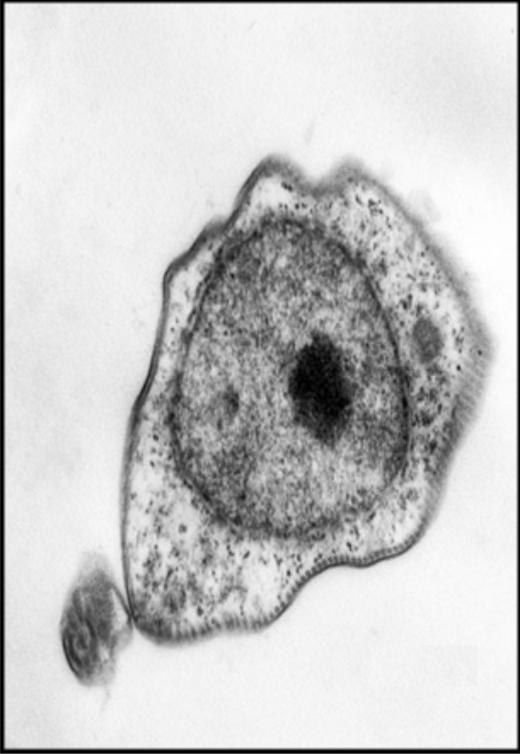
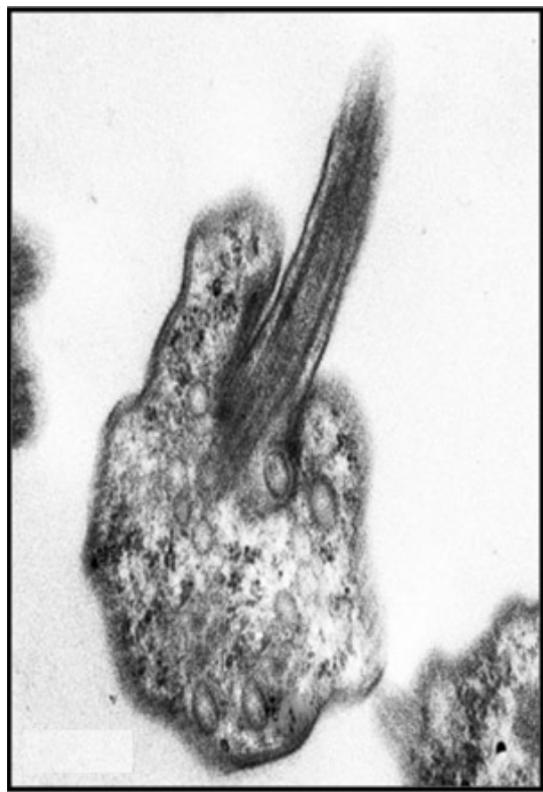
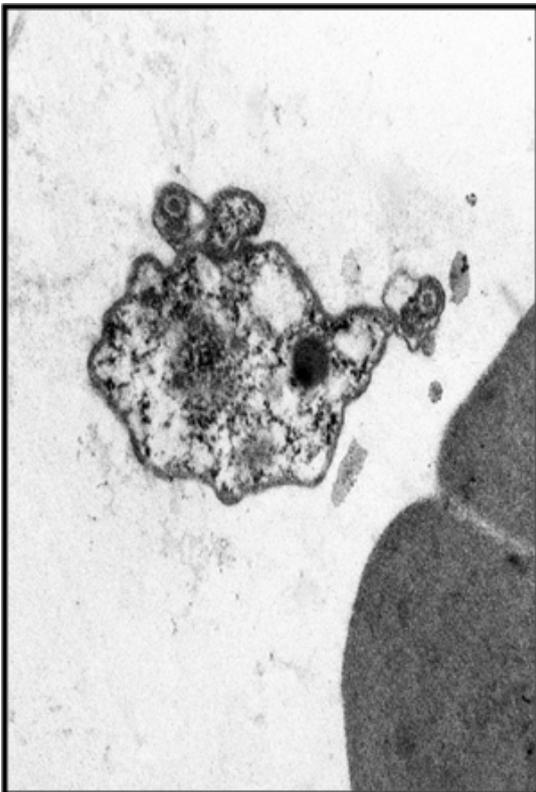
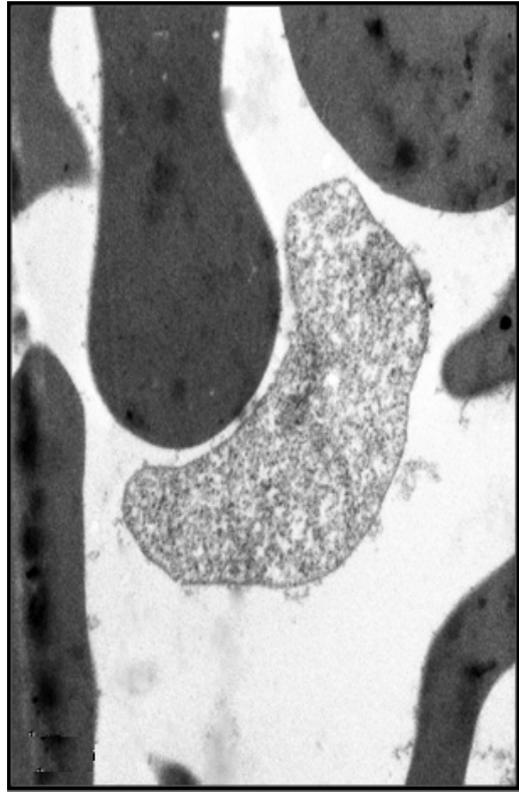
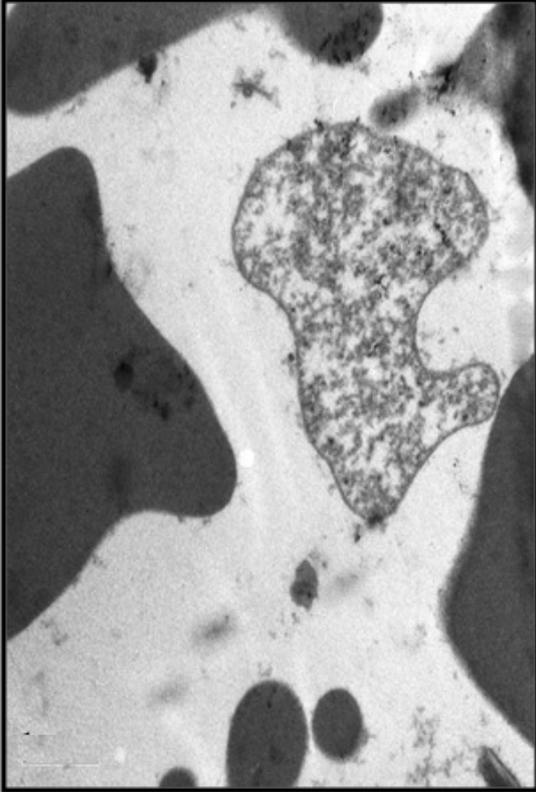


Figura 19: Descripción ultraestructural de tripomastigotes de 48 horas de un cultivo In Vitro con *Trypanosoma evansi* aislado “Teva 1” y un tratamiento de Pamidronato a 75 μ M.

Figura 19a y 19b. En estas micrografía se puede observar pérdida del citoesqueleto del parásito (cabeza de flecha), así como también de la estructura organelar (asterisco) y que se encuentran en un estado de muerte celular.

Figura 19c. Tripomastigote con extracción del contenido citoplasmático (asterisco), se observa todavía la red de microtúbulos sub-peliculares (cabeza de flecha) y el flagelo (F).

Figura 19d. Aquí se observan zonas electrón transparente (asterisco), el flagelo (F) y algunas vesículas (v).



A continuación se mostrará el seguimiento ultraestructural, en dos puntos de parasitemia (medio y alto) de una infección experimental con el aislado “Teva 1”.

Las micrografías de las infecciones experimentales en murinos con *Trypanosoma evansi*, aislado “Teva 1” (Figuras 20 y 21), mostraron ultraestructuralmente escasas alteraciones a medida que avanzó el tiempo de infección. En un punto medio de parasitemia (5 días post infección) observaron estructuras normales como núcleo, nucléolo, glicosomas, flagelos y acidocalcisomas. En el punto más alto de la infección con este aislado (7 días) se observaron pequeñas zonas de extracción de contenido citoplasmático además de las organelas antes mencionadas en estado normal.

Seguidamente se mostrará el seguimiento ultraestructural, en dos puntos de parasitemia (medio y alto) de una infección experimental con el aislado “Teva 1” y un tratamiento con Pamidronato.

En las infecciones experimentales en murinos con *Trypanosoma evansi*, aislado “Teva 1”, y un tratamiento de droga (Figuras 22 y 23) las alteraciones ultraestructurales se mantuvieron escasas a medida que avanzó el tiempo de infección. En un punto medio de parasitemia (5 días post infección) se observaron estructuras normales como núcleo, nucleolo, glicosomas, flagelos y acidocalcisomas. En el punto más alto de la infección con este aislado (7 días) se observaron algunas zonas de extracción de contenido citoplasmático, acidocalcisomas con cristales de calcio mas electrón densos y las organelas antes mencionadas en estado normal.

Figura 20: Descripción ultraestructural de tripomastigotes a 5 días de post-infección experimental de murinos NMRI con *Trypanosoma evansi* aislado “Teva 1”.

Figura 20a. Tripomastigote mostrando el flagelo (F), alguno glicosomas (círculo) y un acidocalcisoma con su cristal de calcio en buen estado (estrella).

Figura 20b. Se observa un tripomastigote en donde se puede ver el flagelo (F), el núcleo (N) con su nucléolo (n) en un estado normal.

Figura 20c. En esta micrografía se observa el núcleo (N), la barra flagelar característica de los tripanosomas (asterisco), múltiples ribosomas en el citoplasma (flecha) y el flagelo (F).

Figura 20d. En este tripomastigote podemos observar su núcleo (N), su nucléolo (n), el flagelo (F) y unos eritrocitos a su alrededor (E).

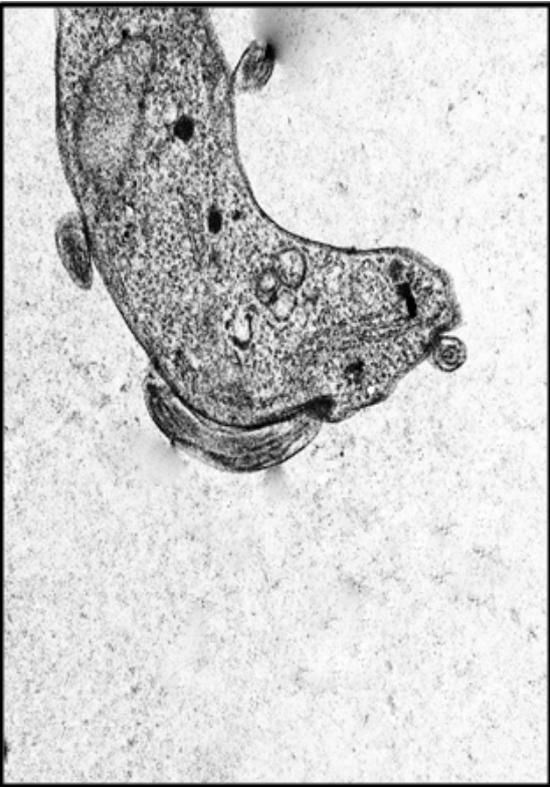
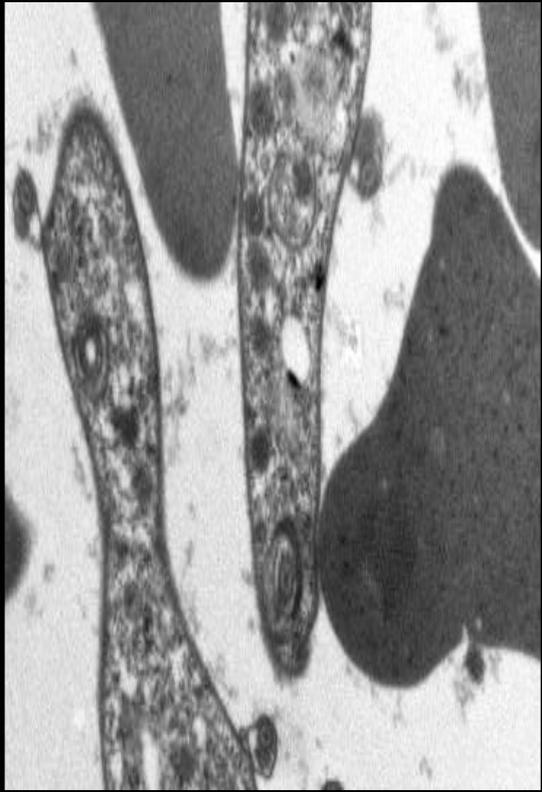


Figura 21: Descripción ultraestructural de tripomastigotes a 7 días de post-infección experimental de murinos NMRI con *Trypanosoma evansi* aislado “Teva 1”.

Figura 21a. Se puede observar tripomastigotes en donde se distingue el núcleo (N) y heterocromatina condensada en la periferia (cabeza de flecha), el flagelo (F), acidocalcisomas con su cristal de calcio (estrella) y algunos glicosomas (circulo).

Figura 21b. Estos tripomastigotes se observa el núcleo (N), la heterocromatina condensada (cabeza de flecha), el flagelo (F) y algunas zonas electrón transparente (asterisco).

Figura 21c. Este tripomastigote nos muestra el núcleo (N) del parásito, su nucléolo (n), acidocalcisomas con disposición en “media luna” del cristal de calcio (estrella) y algunas cisternas del retículo endoplasmático (RE).

Figura 21d. Tripomastigote que muestra el núcleo (N), el nucléolo (n), el bolsillo flagelar (BF) con el flagelo (F) y múltiples ribosomas (flecha) en el citoplasma.

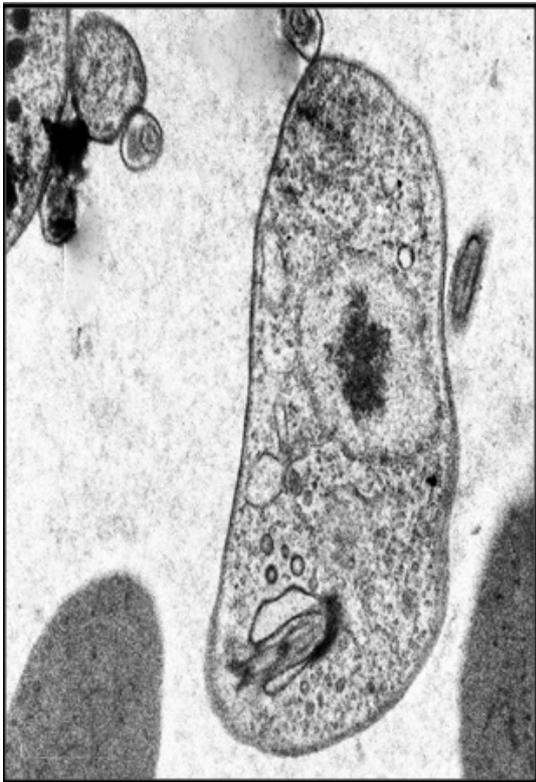
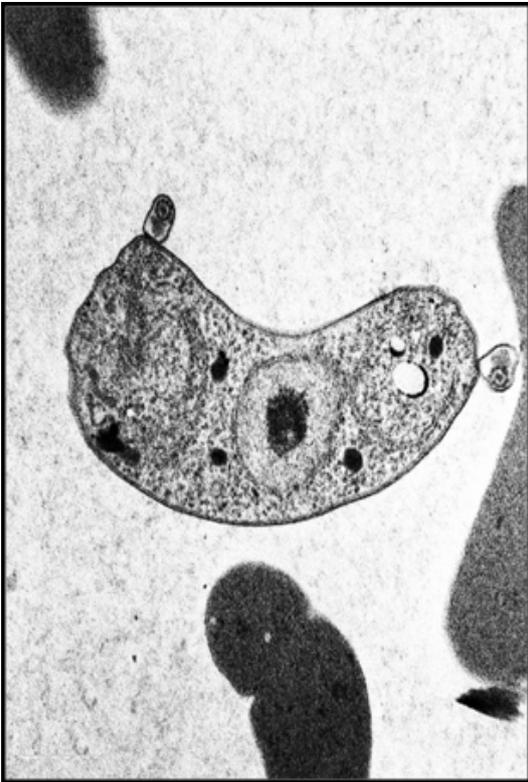
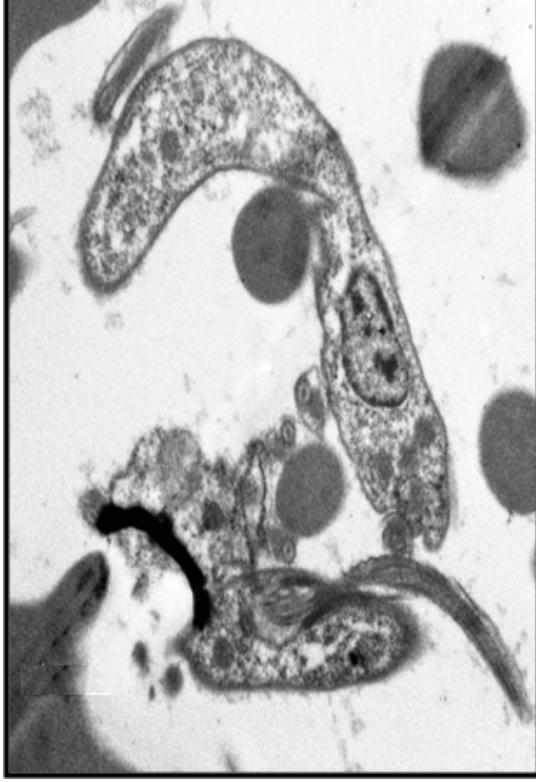


Figura 22: Descripción ultraestructural de tripomastigotes a 5 días de post-infección experimental de murinos NMRI con *Trypanosoma evansi* aislado “Teva 1” y un tratamiento de Pamidronato 7,5 mg/Kg.

Figura 22a. Se observa un tripomastigote mostrando el flagelo (F), múltiples ribosomas en el citoplasma (flecha) y la red de microtúbulos sub-peliculares (asterisco).

Figura 22b. En este tripomastigote podemos observar el núcleo (N), su nucléolo (n), el flagelo con su distribución de microtúbulos normales (F) y acidocalcisomas con su cristal de calcio (estrella)

Figura 22c. En esta micrografía se observan dos tripomastigotes en los cuales se observa fácilmente el flagelo (F), algunos glicosomas (círculos), acidocalcisomas (estrella) y la red de microtúbulos sub-peliculares (asterisco).

Figura 22d. Tripomastigote en el que se distingue el cinetoplasto (C) rodeado por la mitocondria (M), un glicosoma (circulo) y parte del retículo endoplasmático rugoso (RE).

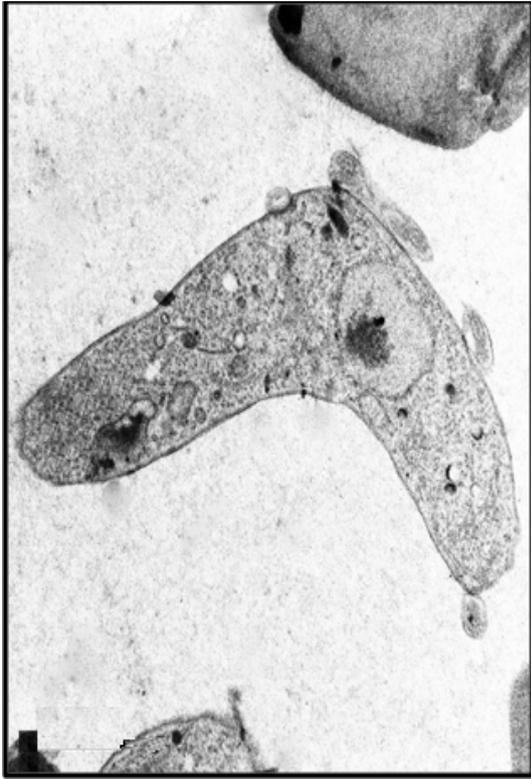
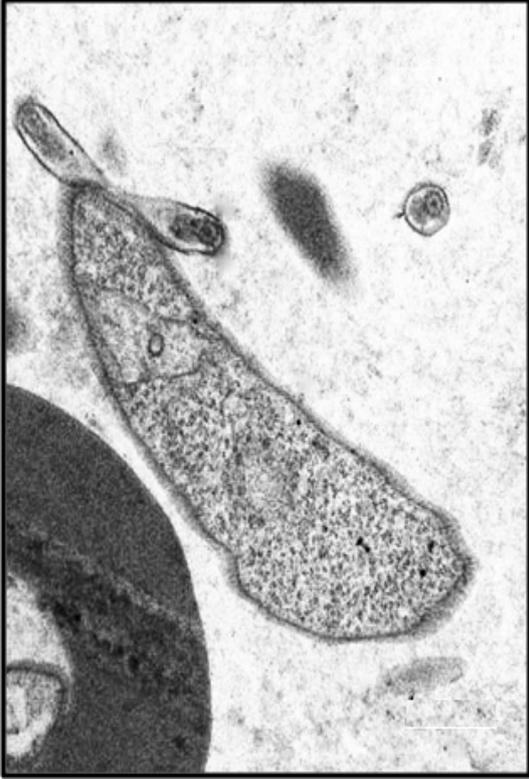


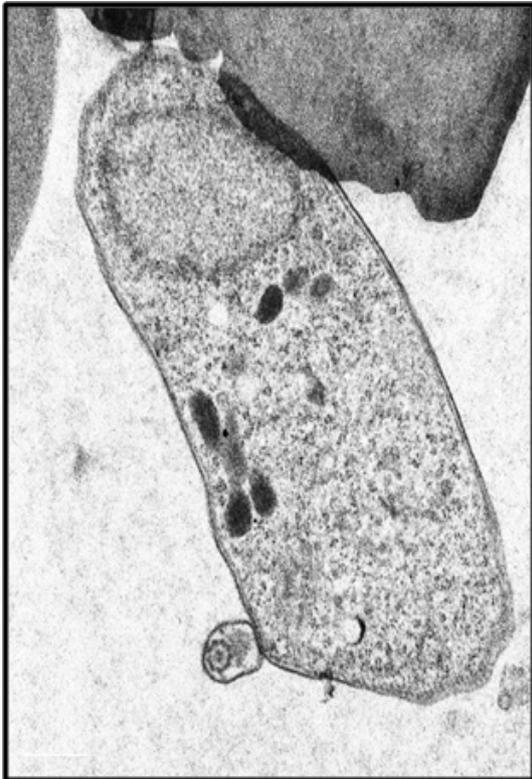
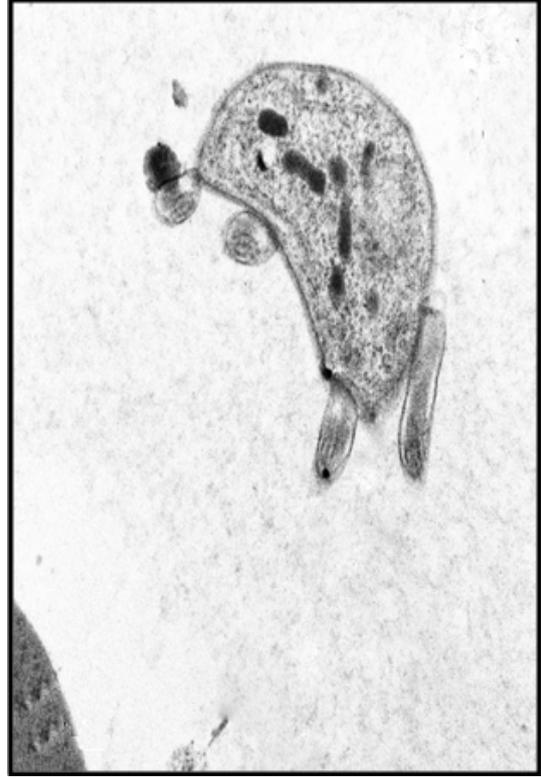
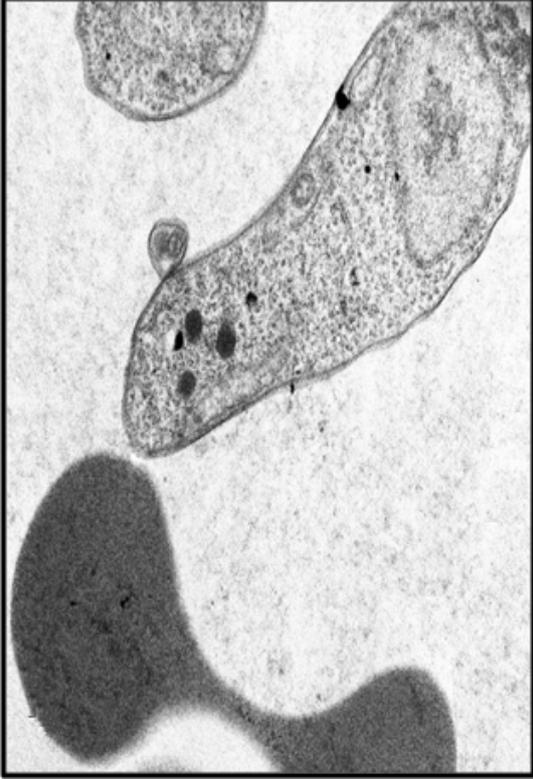
Figura 23: Descripción ultraestructural de tripomastigotes a 7 días de post-infección experimental de murinos NMRI con *Trypanosoma evansi* aislado “Teva 1” y un tratamiento de Pamidronato 7,5 mg/Kg.

Figura 23a. Tripomastigote mostrando un acidocalcisoma con el cristal de calcio (estrella), el núcleo (N) con su nucléolo (n), glicosomas (círculos) y el flagelo (F).

Figura 23b. Este tripomastigote muestra glicosomas (círculo), un acidocalcisoma (estrella), múltiples ribosomas en el citoplasma (flecha) y el flagelo (F).

Figura 23c. Se puede distinguir en este tripomastigote el núcleo (N), los glicosomas (círculos), la red de microtubulos sub-peliculares (asterisco), el flagelo (F) y un acidocalcisoma con disposición del cristal de calcio en “media luna” (estrella).

Figura 23d. Entre los eritrocitos (E) observamos tripomastigotes mostrando acidocalcisomas un cristal de calcio más electrón denso (estrella), regiones de extracción de contenido citoplasmático (asterisco) y el flagelo (F).



IV. Análisis Molecular

Esta sección comprende la descripción del gel de agarosa en donde se puede apreciar el ADN genómico de *Trypanosoma evansi*. En las infecciones experimentales con los aislados “El Mantecal” y “Teva1”, el ADN genómico se obtuvo mediante la purificación de los parásitos en una columna de DEAE-celulosa y posterior aislamiento del ADN mediante la utilización de un Kit comercial. En el caso de los cultivos el ADN genómico de los parásitos se obtuvo directamente del cultivo por centrifugación y posterior purificación con un Kit comercial.

Figura 24. Se muestra la imagen de un gel de agarosa al 0.8%, donde se observa el ADN genómico extraído de dos aislados (“El Mantecal” y “Teva1”), en infecciones experimentales y cultivos *In Vitro* tratados y no tratados con un bisfosfonato (Pamidronato).

En este gel podemos observar la integridad del ADN genómico en los grupos control del cultivo *In Vitro* a las 24 y 48 horas, en las infecciones experimentales con el aislado “El

Mantecal” con y sin tratamiento de droga a los 11 días y finalmente en las infecciones experimentales con el aislado “Teva1” a los 5 días con y sin el tratamiento de droga.

La integridad del ADN genómico estuvo comprometida en los cultivos a medida que la concentración de la droga aumentó, hasta llegar a 75 y 100 μM donde se puede observar degradación del ADN genómico en dos unidades. En el caso de las infecciones experimentales de ambos aislados los puntos bajos de parasitemia mantuvieron la integridad del ADN incluso en aquellos con tratamientos de la droga. Sin embargo, al incrementar los días de infección se puede observar degradación del ADN genómico para ambos aislados y con el tratamiento de droga.

DISCUSION

Los procesos de muerte celular en organismos unicelulares han sido foco de estudio de diversos autores en la última década (Debrabant y Nakhasi 2002; Ouaiissi, 2003; Nguewa *et al.* 2004; Figarella *et al.* 2005; Finky Cookson. 2005; Duzensko *et al.* 2006; Welburn *et al.* 2006; Soeiro y De Souza. 2007; Menna-Barreto *et al.* 2008 y De Souza *et al.* 2010 entre otros). Los tipos de muerte celular en estos organismos pueden llegar a tener algunas similitudes fenotípicas con organismos multicelulares, sin embargo recientes alcances muestran que a pesar de estas similitudes, existen características morfológicas y moleculares en las formas de muerte que abiertamente muestran diferencias (Zanger *et al.* 2002). Es por ello que aunque en organismos multicelulares se hayan descrito hasta la fecha 11 formas diferentes de muerte celular (Kroemer *et al.* 2009), los organismos unicelulares no poseen los mismos patrones o comportamiento (Debrabant y Nakhasi, 2002); siendo un ejemplo de esto la señalización por medio de caspasas que llevan a la apoptosis en organismos multicelulares y que se ha comprobado no están presentes en tripanosomatídeos (Duszenko *et al.* 2006)).

La muerte celular en Tripanosomatídeos ha sido de gran interés, ya que la complejidad de sus organelos y la de sus ciclos de vida les han permitido hospedar una amplia variedad de vertebrados, haciéndolos así responsables de diversas e importantes enfermedades (Ouassi, 2003). Es importante el hecho que muchas investigaciones han ido hacia la evaluación de tratamientos quimioterapéuticos para estas enfermedades, algunos eficientes y otros no, mientras muy pocas han dirigido su atención a las limitaciones del crecimiento del parásito que se generan por sus propias vías de muerte celular (Welburn *et al.* 2006). Es por ello que el estudio de las formas de muerte de estos organismos representa una necesidad importante en el establecimiento de nuevas vías de control de las enfermedades que estos generan.

De esta forma, se han establecido diversas técnicas para el estudio de las vías de muerte celular en Tripanosomas. Figarella *et al.* en el 2005, realizaron estudios en búsqueda de necrosis, autofagia y apoptosis, en donde utilizaron microscopía electrónica de transmisión. Esta técnica es muy usada ya que permite explorar cambios ultraestructurales con alta

resolución, tener la capacidad de observar el interior celular representa una ventaja para el estudio de alteraciones en estos parásitos. Así la MET es una de las mejores técnicas para la obtención de características morfológicas asociables a procesos de muerte celular.

Por otro lado, el estudio de los cambios genotípicos que se generan durante un proceso de muerte celular es, al igual que la MET, una herramienta idónea para la descripción de dicho proceso (Lee *et al.* 2002). Esto debido a que los daños que se ocasionan a nivel del ADN de estos organismos, pueden reflejar la acción de nucleasas u otros factores que comprometen su integridad, como respuesta a un proceso perjudicial para la supervivencia de la célula (Zanger *et al.* 2002).

Los procesos de muerte celular en los tripanosomatídeos pueden ser generados por múltiples vías; de estas vías pocas son las que se conocen, por lo que la serie de mecanismos que desarrollan un proceso necrótico, apoptótico o de otro tipo en estos parásitos resulta bastante incierta. A la hora de estudiar estos procesos de muerte se utilizan algunos inductores que han sido reportados que llevan a la muerte de estos organismos (Ameisen *et al.* 1995; Fang y Beattie, 2003; Nguewa *et al.* 2004; Duszenko *et al.* 2006). Particularmente la alta densidad poblacional de los tripanosomatídeos en el hospedador representa una forma de inducir muerte celular, ya que el comprometimiento de los nutrientes o la posible muerte del hospedador cuando las poblaciones son elevadas, puede desencadenar una regulación que busca establecer un equilibrio parásito–hospedador (Debrabant *et al.* 2003). Así mismo, se ha establecido que algunos agentes quimioterapéuticos (drogas) también pueden inducir procesos de muerte celular, incluyendo muerte celular programada (Soeiro y De Souza, 2007). Así la utilización de una droga y la evaluación a altas densidades poblacionales en la descripción de estos procesos, son inductores altamente empleados en el estudio de muerte celular en tripanosomatídeos (Figarella *et al.* 2005; Menna-Barreto *et al.* 2009; De Souza *et al.* 2010), razón por la cual se utilizaron en esta investigación de *Trypanosoma evansi*.

Además de los inductores, la MET y el análisis de ADN, se utilizaron algunas técnicas y condiciones que fueron empleadas para la evaluación de muerte celular en *Trypanosoma*

evansi como lo son: los extendido o frotis, que permitieron evaluar cambios en la morfometría del parásito, y las condiciones *In Vivo* e *In Vitro*, que llevaron a la evaluación de la intervención del sistema inmune y otras relaciones parásito-hospedador en la muerte de estos organismos.

Trypanosoma evansi presenta una gran versatilidad de reacción ante estrés ambiental, controversias se han generado respecto a la existencia de múltiples especies, “razas” o sinonimias geográficas (Hoare, 1972; Kassai et al. 1988; Quiroz, 2005). Es por ello que, para la descripción de los procesos de muerte celular, seleccionamos dos aislados con conductas disimiles en cuanto a su agresividad que se traduce en prepatencia y tiempo total de la infección diferentes; esto de manera de evaluar si dichas diferencias entre aislados repercuten en la forma en la que estos organismos incurren en procesos de muerte. Ambos aislados provienen de *E. caballus*, “El Mantecal” de estado Apure y “Teva1” de estado Guárico.

I. Análisis Parasitológico y de Extendidos

En esta sección analizaremos las características parasitológicas, como respuesta y/o modificaciones fisiológicas al sustrato en el que se desarrollan los tripanosomas. Así mismo analizaremos extendidos de los diferentes modelos y tratamientos utilizados.

Los resultados de las infecciones experimentales evidenciaron una marcada variabilidad en la duración del período de prepatencia entre los dos aislados, así como en el tiempo total de la infección (Gráfica 1). Esta diversidad de comportamiento parasitológico pudiera estar atribuida a las particularidades de los mecanismos de interacción parásito-hospedador (Dávila, 1998; Poulin *et al.* 1999). La virulencia y patogenicidad de cada aislado, basadas entre otras cosas en el origen del material infectante y el estado fisiológico e inmunológico del mamífero, se pueden explicar no como variables independientes sino como el producto de la interacción del complejo constituido por ambos socios (parásito-hospedador) (Casadevall y Pirofsky, 2001 y Vergel, 2007). Lo cual nos va mostrando diferencias importantes entre los aislados que pueden estar presentando vías desiguales de muerte.

En consecuencia con lo obtenido, Perrone, 2003 y 2006 y Tejero *et al.* 2008 reportaron que el grado de infectividad y virulencia varía ampliamente entre los aislados venezolanos de *Trypanosoma evansi*. El aislado “Teva1” es uno de los más agresivos que existen en los descritos de Venezuela, por ocasionar la muerte de aproximadamente 97% de los ratones infectados a los 8 días post infección, mientras “El Mantecal” resulta ser menos agresivo eliminando la población de ratones inoculados en 18 días post infección.

Los grupos de la infección que fueron tratados con la droga (Pamidronato) no mostraron diferencias estadísticamente significativas con respecto a los grupos que no la recibieron (Gráfica 1), sin embargo, una disminución de la parasitemia entre dichos grupos es distinguible. Esta disminución ha sido encontrada por Urbina *et al.* (1999), Martin *et al.*, (2001) y Montalvetti *et al.* (2001), quienes afirman que se debe a la actividad tripanocida de los bisfosfonatos. De esta forma, aunque no se produjo una diferencia estadísticamente significativa, podemos atribuirle a la droga una disminución en la población de parásitos de este grupo.

En el caso de los cultivos *In Vitro* iniciamos con una parasitemia de 1×10^5 , considerándolo en la fase de crecimiento exponencial, que es la adecuada para la evolución del cultivo (Saldaña *et al.* 2006). Después de 24 horas todas las réplicas habían alcanzado exitosamente puntos cercanos a 1×10^6 ; una vez que se aseguró que el crecimiento del cultivo fue exitoso se procedió a añadir la droga, esto de manera que hubieran suficientes parásitos para poder observar el efecto que la misma produce.

El cultivo duró un total de 96 horas para los controles y 72 horas para aquellos grupos tratados con droga (Gráfica 1). El chequeo de la parasitemia y otras técnicas utilizadas se llevó a cabo a las 48 horas, esto debido a que fue el punto en donde se encontraron parásitos en la mayoría de los tratamientos con droga y control, pudiendo establecer así una mejor comparación que en otros puntos de toma de muestra.

En este punto de 48 horas se puede observar como ocurrió una inhibición de la proliferación de los tripomastigotes en aquellos tratamientos con la droga (Gráfica 1), obteniendo así un 50% de inhibición a (25 μM) (Ver gráfica 2), resultado que es menor al encontrado por Urbina *et al.* en 1999 en *Trypanosoma cruzi* (60 μM). Esto se puede deber a que dicho parásito tiene un ciclo de vida diferente, que requiere de adaptaciones metabólicas importantes entre los hospedadores que habita (intestino del invertebrado y torrente sanguíneo e intracelular en el vertebrado), poseyendo así diferentes morfotipos (amastigote, promastigote, epimastigote y tripomastigote) con diversas vías de generación de energía que lo ayudan a sobrevivir en diferentes ambientes (Palau, 2000). Esto puede generar mayor resistencia que la que presenta *Trypanosomas evansi*, el que muestra un solo morfotipo y se divide únicamente en el torrente sanguíneo del hospedador mamífero (Hoare, 1972).

Las observaciones de los extendidos pretenden mostrar el estado de los tripomastigotes en sangre en diferentes puntos de infección y bajo el tratamiento de la droga. Es fácilmente distinguible en los extendidos provenientes de las infecciones con ambos aislados el estado normal del flagelado rodeado por eritrocitos. Cambios a nivel de los tratamientos con droga no son distinguibles.

En el caso de los cultivos *In Vitro* no se observan grandes cantidades de eritrocitos e igualmente son visibles tripomastigotes en buen estado a 25 y 50 μM , sin embargo, en el caso de la concentración de droga de 75 μM , pérdida de la tinción del núcleo es observable. Tomando en cuenta que la coloración con Giemsa permite la tinción diferencial de zonas con un alto contenido de ADN (concretamente las uniones A-T), esta particularidad pudiera relacionarse con algún tipo de degradación del contenido genético de los parásitos (Brown y Febiger, 1993).

Es importante resaltar que la dosis de 100 μM eliminó en las primeras 24h de tratamiento a todos los tripomastigotes, por lo que no se pudo observarlos ni procesarlos para la realización de los extendidos, la MET ni el análisis del ADN genómico. Esta temprana inhibición se debió a que la concentración de la droga resulto ser mucho más tóxica que las

anteriores, disminuyendo en menor tiempo la cantidad de parásitos que se encontraba en el cultivo.

La utilización de las tinciones permite distinguir con claridad el estado general de los tripomastigotes, sin embargo, a este nivel establecer diferencias relacionadas a alteraciones que nos permitan discernir procesos de muerte celular no es sencillo. A pesar de esto, un estudio más cuantitativo de los extendidos puede revelar cambios entre los tratamientos, el aislado y el tiempo de infección, que permitan distinguir alguna alteración.

Es por ello que se realizó un estudio morfométrico que pudiera extraer más información de los extendidos realizados. Así en la siguiente sección analizaremos cambios mesurables que se producen en el desarrollo de los flagelados dependiendo del aislado, el tiempo de infección y los tratamientos con Pamidronato; en infecciones experimentales y en cultivos *In Vitro*.

II. Análisis Morfométrico

A los extendidos observados en la sección anterior se les realizaron medidas de manera de llevar a cabo un análisis morfométrico de los cambios que pueden estar ocurriendo a lo largo de la infección. Así se pudo distinguir patrones de cambios morfológicos a lo largo del desarrollo de los flagelados del aislado “El Mantecal” y el aislado “Teva1”. Las variables estudiadas muestran cambios alométricos que al realizar un análisis de la varianza (ANOVA) muestran ser estadísticamente significativos, $p < 0.05$ (Tablas 2 y 3), en función del tiempo, que no son progresivos. Estos cambios son alométricos por cuanto son cambios en la dimensión relativa de la longitud corporal (LC) y distancia de ancho corporal (A) correlacionados con los cambios en el tamaño total.

Es importante destacar que, incluso cuando diferencias en la virulencia e infectividad de los aislados fueron encontradas y han sido reportadas anteriormente (Perrone *et al* 2003), dichos aislados mostraron un patrón general similar en cuanto a la forma de cambio tanto para las longitud corporal (LC) como para la distancia del ancho corporal (A). Ello indica que a pesar de tener comportamientos parasitológicos disimiles el aumento de ambas

variables medidas a lo largo de la infección es común para los dos aislados (Grafica 3 y 4), esto ha sido explicado también por Tejero *et al.* 2008.

Al analizar el patrón de cambio de los grupos tratados con droga con respecto a los grupos no tratados con ANOVA, una diferencia estadísticamente significativa es encontrada para ambos aislados en las variables LC y A ($p = 0.0000$, Tabla 2 y 3). Así mismo el análisis estadístico de las variables LC y A muestra diferencias significativas entre los aislados “El Mantecal” y “Teva1” ($p = 0.009578$ y $p = 0.000275$, Tablas 2 y 3) al igual que en el transcurso de la infección ($p = 0.0000$, Tablas 2 y 3). Estos resultados revelan entonces que la dimensionalidad del parásito varía significativamente: (1) al avanzar los días de infección, debido probablemente a la evolución hacia formas alargadas y de gran porte características de altas parasitemias (Roschman-González, 2010), (2) entre los aislados de “El Mantecal” y “Teva1” ya que, a pesar de que en ambos el patrón de aumento es igual, la duración de la infección es marcadamente disímil resultando en diferencias cuantitativas importantes, y (3) entre los tratamientos infección e infección más droga, debido probablemente a la acción tripanocida de la misma sobre los tripomastigotes (Urbina et al. 1999).

La variable de longitud corporal (LC), como lo mencionamos anteriormente, incrementó en magnitud a lo largo de las infecciones con ambos aislados y tratamientos al igual que la variable de distancia de ancho corporal (A). Este aumento en ambas medidas, supone un crecimiento uniforme del parásito, sin embargo en el aislado “El Mantecal” un punto de disminución de las magnitudes morfométricas es distinguible hacia el final de la infección (Graficas 3 y 4). Si bien esta disminución puede ser debida a la heterogeneidad de las poblaciones de parásitos, vale la pena destacar que en las fases de parasitemia tardía se encuentran altas cargas parasitarias que comprometen los recursos alimenticios del sistema, generándose en consecuencia, un proceso de competencia por los nutrientes (González, 2010). Tal fenómeno puede provocar una degeneración en la morfología del parásito que no posee suficientes recursos para sobrevivir, pudiendo justificar así la disminución en las variables antes mencionada.

Los grupos que reciben un tratamiento de droga (durante los primeros 7 días), para ambas variables muestran una disminución en el patrón de crecimiento que es más marcada en los primeros días que hacia el final de la infección, por cuanto la droga tendrá su mayor efecto en el período de duración del tratamiento. Así mismo el error estándar incrementa al final, mostrando como la población de parásitos en los animales tratados con droga, es bastante heterogénea, en cuanto a sus medidas, en los últimos días de infección (Gráficas 3 y 4); esto puede implicar que el efecto de la droga fue más marcado y uniforme al inicio, cuando el tratamiento era continuo.

Es conocido que los bisfosfonatos tienen capacidad tripanocida (Montalvetti *et al.* 2001) y en los resultados de la Parasitemia esto pudo ser distinguido. Así mismo cambios morfométricos, en aquellos grupos que recibieron un tratamiento de Pamidronato, reportaron patrones de disminución en la LC y el A de los tripomastigotes con respecto a los grupos no tratados (Gráficas 3 y 4). Si bien no existen reportes de patrones de cambios morfométricos por uso de ésta droga en los aislados tratados, estos resultados son consistentes con el hecho de que los bisfosfonatos comprometen el estado normal del parásito (Urbina *et al.* 1999).

A nivel de los experimentos *In Vitro* el análisis de la varianza (ANOVA) mostró un patrón que se asemeja al de las infecciones experimentales en ambas variables, donde el crecimiento de los parásitos sigue un patrón de cambios a lo largo del cultivo, que es mayor en magnitud a aquel obtenido en los tratamientos con droga (Gráficas 3 y 4). Los grupos controles que no recibieron la droga, mostraron un incremento significativo en el transcurso de las horas de ambas variables ($p = 0.0000$, Tablas 2 y 3) y una disminución hacia el final del cultivo que puede deberse entre otras cosas, como se mencionó anteriormente, a el comprometimiento de la dimensionalidad morfométrica por disminución de los nutrientes en las altas parasitemias. Cabe destacar que en aquellos grupos que recibieron concentraciones más elevadas de droga, las variables LC y A disminuyeron significativamente ($p = 0.0000$, Tablas 2 y 3) en mayor magnitud. Esto puede deberse a que al aumentar la toxicidad, como respuesta a un incremento de la concentración, el estado normal del parásito se ve cada vez más comprometido.

De manera de analizar a mayor profundidad la diferencias existentes en el cambio de LC y A entre los aislados, los tratamientos, el tiempo de infección y duración del cultivo, se realizó un análisis de la varianza de dos vías. Así se puede observar cómo cambian dichas variables al compararse entre dos factores, para nuestro caso estos factores son los tratamientos (Con droga y sin droga), los aislados (“El Mantecal” y “Teva1”) y los días de la infección.

La variable LC en las infecciones experimentales (Gráfica 4) analizada con este procesamiento estadístico de dos vías, mostró que LC cambia significativamente entre los aislados a lo largo de la infección ($p = 0.000281$, Tabla 2), sin embargo los tratamientos no muestran cambios en el transcurso de los días ($p = 0.474569$, Tabla 2) al igual que no se muestran cambios significativos en la variable LC de los tratamientos entre los aislados ($p = 0.133077$, Tabla 2). A partir de estos resultados deducimos que el comportamiento de la droga es similar, independientemente del aislado, respecto a su acción sobre la longitud corporal de los tripomastigotes y que a medida que la infección avanza, el incremento de la longitud corporal cambia significativamente entre los aislados.

Para la variable de distancia de ancho corporal (A) en las infecciones experimentales, los análisis de la varianza de dos vías mostraron que, contrario a la variable LC, no existen diferencias significativas en el ancho corporal de los aislados a medida que la infección avanza ($p = 0.491882$, Tabla 3). Así mismo no se encontraron diferencias en el cambio de A de los tratamientos ni en el transcurso del tiempo ($p = 0.341067$, Tabla 3) ni entre los aislados ($p = 0.992973$, Tabla 3); lo que muestra que el comportamiento de la droga sobre esta variable, al igual que la LC, sigue un patrón similar tanto entre los aislados como a lo largo de la infección.

En el caso de los cultivos *In Vitro*, al hacer el análisis de la varianza de dos vías, se consiguieron diferencias significativas en el patrón de cambio de la LC y el A de los tratamientos a lo largo del tiempo de cultivo ($p = 0.000015$ y $p = 0.040348$, Tablas 2 y 3). Esto llama la atención por cuanto en las infecciones experimentales no se encontró que la

acción de la droga modificara en forma diferencial la longitud corporal o el ancho corporal a lo largo de la infección; esto se puede deber a que el efecto de la droga en los grupos tratados del cultivo es más marcado, como se observa también parasitológicamente, que en el caso de las infecciones experimentales.

Habiendo encontrado a nivel morfométrico diferencias entre los grupos tratados y no tratados con droga además de en función del tiempo, un estudio más profundo de estos cambios como características asociables a procesos de muerte celular es ineludible. Es por esto que nos avocamos a un análisis extensivo de la ultraestructura de los aislados de *Trypanosoma evansi* con y sin tratamiento de Pamidronato en infecciones experimentales y en cultivos *In Vitro*.

En la siguiente sección analizaremos las características morfológicas ultraestructurales de las infecciones realizadas en murinos y en cultivos *In Vitro*, los cuales fueron tratados con una droga para probar su capacidad inductora de procesos de muerte celular.

III. Análisis Ultraestructural

Los estudios en tripanosomas los han caracterizado por poseer atributos biológicos únicos, como compartimentación de la vía glucolítica, mitocondria pre-adaptada a cambios ambientales bruscos, un ADN mitocondrial compactado en una red concatenada de maxicírculos y minicírculos, organización particular del citoesqueleto, barra paraxial en el flagelo y un sistema endocítico perfectamente polarizado (De Souza, 1984). Estos estudios previos aportan una base de conocimientos sobre la ultraestructura normal de parásito que es de gran utilidad para diferenciar las posibles alteraciones a este nivel.

En esta sección se discuten los resultados de la ultraestructura de los aislados “El Mantecal” y “Teva1” en infecciones experimentales y cultivo *In Vitro*; sin incluir para este último el aislado “El Mantecal”, ya que su crecimiento en los medios de cultivos no fue exitoso. En el caso de las infecciones experimentales, se discutirán los resultados obtenidos en puntos estratégicos y no a lo largo de toda la infección, ya que al escoger días de baja, media y

alta parasitemia aseguramos cubrir las posibles alteraciones que se pueden suscitar en el parásito; además la obtención de las muestras de tripomastigotes para MET deben provenir de ratones con una parasitemia de mínimo 1×10^5 para asegurar su observación al microscopio.

En la infección experimental con el aislado “El Mantecal” la ultraestructura observada en las micrografías de un punto de baja Parasitemia, mostró a los tripomastigotes de *T. evansi* en un estado en donde se observaron estructuras sub-celulares normales (Figura 10). Se distinguió el núcleo, ubicado generalmente en la región central del flagelado, con la aparición en muchos casos del nucléolo en el centro del nucleoplasma (Figura 10d); este organelo contiene el ADN nuclear del parásito y se puede observar normalmente la concentración de la cromatina hacia la periferia (De Souza, 2008). Al comienzo del proceso de división celular ocurre la dispersión de la cromatina, dando al núcleo un aspecto homogéneo, lo cual es observable en algunas de las micrografías (Figura 10b) al inicio de la infección (Solari *et al.* 1995).

El estado del flagelo mostró en algunas micrografías la invaginación a la membrana que forma el bolsillo flagelar y el axonema típico (Figura 10a), que presenta un estándar de nueve pares de microtúbulos periféricos y un par central (Farina *et al.*, 1986). Así mismo se observaron acidocalcisomas en estado normal (Figura 10a), que dependiendo del método de preservación puede o no perder el cristal electrón denso de calcio, éste usualmente lo observamos unido a un extremo de la membrana del organelo (Docampo, 2008).

Se pudieron distinguir a lo largo del citoplasma glicosomas que son reconocidos por poseer una única membrana y una matriz homogénea (Ver figura 10a), a estos organelos se le asignó ese nombre por encontrarse ubicado en su interior las rutas glicolíticas del organismo (Opperdoes & Borst 1977). Por su parte el cinetoplasto se observó en un extremo de un tripomastigote mostrándose como una región electrón densa rodeada por la mitocondria (Figura 10d), esta región contiene el ADN concentrado de la única mitocondria reticulada presente en el parásito (Steinert *et al.* 1958).

A medida que esta infección experimental con el aislado “El Mantecal” avanza se alcanza un punto medio en la parasitemia, si bien se mantiene bastante conservada la estructura organelar descrita en puntos bajos de parasitemia (Figura 11), una alteración empieza hacerse visible, como lo es la pérdida del contenido citoplasmático que es observado como zonas electrón transparentes dentro del parásito (González, 2010) (Figura 11a).

Además se pudo distinguir el incremento en el espacio del bolsillo flagelar (Figura 11c), si bien esta característica ha sido reportada como un cambio morfológico asociado a muerte celular programada (Figarella *et al.* 2005, 2006), estudios de mayor profundidad son recomendables por cuanto esto también podría estar relacionado con un efecto del corte del flagelo.

La evolución de la infección lleva a un incremento de las poblaciones de parásitos; al ser las densidades poblacionales un conocido inductor de muerte celular (Dusenko *et al* 2006), el análisis de los cambios a medida que avanza la infección nos aporta características particulares asociables a este proceso.

Al alcanzar el final de la infección (17 días) con el aislado “El Mantecal” la diversidad de los procesos que generan muerte es alta, produciendo una heterogeneidad de patrones morfológicos elevada con respecto a los puntos analizados anteriormente; puntos donde esta variedad de caracteres morfológicos alterados no fue observada (Figura 12). Como parte de esta heterogeneidad, se puede observar a una célula del sistema inmune fagocitando a un tripomastigote (Figura 12a). Es bien conocido que ante la presencia de un agente infeccioso el sistema inmune de un organismo inicia una respuesta que tiene como fin la eliminación de dicho agente; de este modo el sistema inmune cuenta con una primera línea de defensa (inmunidad innata) que pretende la eliminación rápida pero inespecífica del parásito (Abas *et al.* 2000). Los eosinófilos son granulocitos pertenecientes a esta primera línea de defensa que tienen una respuesta particular en infecciones parasitarias, por cuanto en presencia de antígenos parasitarios poseen un tiempo de generación medular menor y emergen desde la médula en 18 horas; además se ha comprobado que expresan un mayor número de receptores Fc para IgE, IgG y complemento (C3b, C4), lo cual sería una

evidencia de que el parásito influye en la maduración celular (Ackerman *et al.* 1980). La visualización de este granulocito en el punto de infección más alto y no en los anteriores, puede deberse al incremento en las cantidades de parásitos que generan un aumento en la acción del sistema inmune; haciendo así más probable la localización de la actividad de estas células inmunitarias.

Otra de las alteraciones observadas, a altos puntos de parasitemia en esta infección con el aislado “El Mantecal”, es la intensa pérdida del contenido citoplasmático (Figura 12b), esta pérdida puede estar relacionada con extracción proteica por cambios en la estructura de las proteínas a medida que avanza la infección (Roschman-González, 2010). Se observa también un núcleo con zonas electrón transparentes y empaquetamiento bastante irregular de la cromatina (Figura 12b), tomando en cuenta que entre las características más reportadas de muerte celular programada se encuentra condensación de la cromatina (Soeiro *et al.* 2007; De Souza *et al.* 2010; Duszenko *et al.* 2006, entre otros), podemos asociar este patrón de empaquetamiento de la cromatina tan irregular, a un proceso de muerte celular de este tipo. Es importante resaltar el estado de la mitocondria en este mismo caso (Figura 12b), se puede observar pérdida de la doble membrana y una posible edematización; estas características han sido encontradas ultraestructuralmente y estudiadas posteriormente por citometría de flujo confirmando el daño en la membrana y decremento del potencial de membrana del organelo, siendo así otra característica asociable con muerte celular programada (Menna-Barreto *et al.* 2009).

Como parte de las características morfológicas de los procesos que generan muerte celular a alta densidad poblacional de la infección con el aislado “El Mantecal”, se observó una alteración diferente a las ya descritas; esta fue la pérdida de la integridad de la membrana plasmática (Figura 12c). Dicha característica ha estado reportada y relacionada con procesos de muerte celular de tipo necrótica (Kroemer *et al.* 2009). En el caso de Figarella *et al.* en el 2005, la forma en la que detectaban células que estuvieran sufriendo necrosis era por medio de incubación con yoduro de propidio, el cual tiñe únicamente células necróticas debido a la disrupción de la integridad de la membrana plasmática.

Por último en este punto alto de la infección con el aislado “El Mantecal”, se pudo observar una forma particular en la que se encontraron múltiples tripomastigotes; en estos casos no se observa la típica red de microtúbulos sub-peliculares que conforman el citoesqueleto del parásito, así como no se observa la estructura organelar típica (Figura 12d). La formación de estas estructuras llamaron mucho nuestra atención puesto que fueron encontradas en bastante abundancia incluso en los duplicados, sin embargo, después de una búsqueda extensiva de la literatura no pudimos conseguirlas reportadas anteriormente. Esto nos lleva a pensar en estas estructuras como una característica particular en el aislado utilizado de *Trypanosoma evansi*, además también se puede suponer que se trate de eritrocitos con contenido extraído por lo que una visualización a mayor aumento es necesaria.

En la búsqueda de alteraciones que evidenciaran procesos de muerte celular utilizamos un tratamiento con Pamidronato en los murinos infectados con el aislado “El Mantecal”, la ultraestructura de las micrografías obtenidas mostraron que en puntos bajos y medios (5 y 11 días) de la infección, las formas del núcleo, flagelo, red de microtúbulos sub-peliculares y acidocalcisomas se mantuvieron bastante similares a las evaluadas en el caso de la infección sin tratamiento (Figuras 13 y 14). Esto refleja que el estado más representativo de los parásitos a nivel morfológico en la primera etapa de la infección, no muestra alteraciones que manifiesten un proceso de muerte celular.

Al alcanzar un punto alto de la infección (17 días) con el aislado “El Mantecal”, las alteraciones son evidentes y en forma muy similar a las observadas en el caso en el que no se utilizó la droga (Figura 15). La extracción citoplasmática es una anomalía predominante entre los tripomastigotes en este punto (Figuras 15 a, b y c), como mencionamos puede producirse por una extracción de las proteínas del citoplasma. A su vez se visualizaron flagelados en un estado en el que se ha perdido gran parte de los organelos y predominan regiones electrón transparentes con visualización del cinetoplasto, así como condensación y fragmentación de la cromatina reportada usualmente en procesos de muerte celular programada (Debrabant y Nakhai, 2003) (Figura 15c). Por último estuvieron presentes las mismas estructuras mencionadas anteriormente donde se ha perdido tanto el citoesqueleto como la estructura organelar (Figura 15d).

Al haber evaluado los cambios morfológicos en esta infección con el aislado “El Mantecal”, con y sin la adición de un tratamiento con droga, vale la pena mencionar que en estos últimos el análisis ultraestructural no mostró característica que permitiera distinguir un patrón diferente de muerte celular; esto puede deberse a que la duración de esta infección propicia una cantidad de alteraciones que este sesgando las afecciones de la droga al parásito. De esta forma, se sabe que este tratamiento si produjo un efecto en los grupos tratados, por cuanto disminuyó tanto la parasitemia (Gráfica 1) como las variables morfométricas (Gráfica 3 y 4).

De manera de analizar los procesos de muerte celular entre aislados diferentes, se realizó una infección experimental con el aislado “Teva1”, en donde se analizaron dos puntos de parasitemia: uno medio (5 días) y uno alto (7 días). La evaluación en dos puntos, en vez de tres del aislado “El Mantecal” se debe a que dicho aislado es más agresivo y presenta mayor grado de virulencia e infectividad, lo que se traducen en tiempos de infección más cortos (Perrone *et al.* 2003).

En el punto medio de infección (5 días) con el aislado “Teva1”, tripomastigotes con núcleos normales fueron evidenciados en donde además, se distinguía fácilmente el nucléolo (Figuras 20 b y d), formado por la concentración de la eucromatina en el centro del nucleoplasma (De Souza, 2008), así mismo se observan glicosomas, acidocalcisomas y el flagelo en buen estado (Figuras 20 a, b y c); estando esto de acuerdo con lo obtenido en una infección en punto medio con el aislado “El Mantecal”, ya que el estado de los tripomastigotes no suele comprometerse en bajas densidades poblacionales cuando los recursos del sistema aún no son limitados.

Cuando se alcanzó un punto alto de la infección (7 días) con el aislado “Teva1”, las alteraciones en general no fueron igual de marcadas que en la infección con el aislado “El Mantecal”. Se pudieron distinguir algunas zonas de extracción proteica del citoplasma (Figura 21b), así como acidocalcisomas con una distribución menos centrada del cristal de calcio (Figura 21d), y el resto de las estructuras en estado normal. Llama la atención la falta

de alteraciones halladas en este punto alto de la infección, hecho que no es consistente con la variedad de formas de muerte celular encontradas en el aislado “El Mantecal”.

En el caso de una infección con el aislado “Teva1” y un tratamiento de droga, se observó ultraestructuralmente una estructura de los organelos bastante similar a la de la infección sin tratamiento (Figura 22). Igualmente al llegar a un punto alto en parasitemia no pareciera haber alteraciones relevantes que sugieran un proceso activo de muerte celular.

Esta falta de alteraciones ultraestructurales inducidas por altas densidades poblacionales en la infección con “Teva1” lleva a pensar que, la virulencia y agresividad del aislado, no permite apreciar mecanismos de autorregulación de la misma forma que con el aislado “El Mantecal”. Además este corto y letal tiempo de infección puede ser propicio para evadir la respuesta del sistema inmune ya que, aún en la primera línea de defensa, la generación de los componentes a cantidades apropiadas para actuar sobre la infección lleva algunas horas, este tiempo puede ser aprovechado por los tripomastigotes para reproducirse en cantidades incontrolables (Corado, 2003).

Habiendo evaluado las características ultraestructurales de ambos aislados durante sus respectivas infecciones experimentales, vale la pena resaltar que el tamaño del cristal de calcio y su disposición a lo largo del acidocalcisoma, variaron en concordancia con el aumento de la parasitemia o con la adición del tratamiento de droga . Si bien esto pudiera ser tomado como una alteración, no podemos asegurarlo debido a que la cantidad de este material electrón denso puede depender del método de preparación de la muestra para microscopía electrónica. Si se utilizan métodos convencionales para MET parte del material denso puede perderse, ya sea dejando una vacuola vacía o una fina capa de material pegada a la fase interna de la membrana (Docampo, 2008).

Por otro lado, llama la atención la falta de diferencias en las alteraciones morfológicas de los grupos infección e infección más droga de ambos aislados. Debido a que sabemos que la droga sí produjo un efecto en la Parasitemia y morfometría de los tripanosomas, podemos pensar que la concentración de la misma no fue suficiente para ocasionar efectos

masivos en los tripomastigotes; esto es tomando en cuenta que parte de la droga es absorbida del torrente sanguíneo hacia los huesos (blanco original) pudiendo disminuir así su acción (Montalvetti et al. 2001). Tomando esto en consideración se puede suponer que la droga sí tuvo efectos, pero que estos fueron menos marcados que aquellos ocasionados por la alta densidad poblacional y por el sistema inmune, haciendo difícil discernir entre estos patrones de muerte celular.

La realización de cultivos *In Vitro* permitió asegurar que las alteraciones observadas se debió a la acción de la droga, eliminando los efectos del sistema inmune y evaluando por medio de controles (sin tratamiento con droga) los patrones de muerte celular de este tratamiento. Además vale la pena destacar para la realización de estos cultivos, que en el análisis estadístico de los cambios morfométricos, variaciones en las dimensiones del parásito entre los tratamientos con droga y las horas del cultivo fueron encontrados; contrario a las infecciones experimentales donde no se hallaron cambios morfométricos entre los tratamientos con los aislados ni con los días.

En los cultivos *In Vitro* las alteraciones ultraestructurales fueron analizadas a las 48 horas, como se mencionó anteriormente. Además se analizaron alteraciones a diferentes concentraciones de droga, para mostrar la acción de la misma a niveles ascendentes de toxicidad.

Los grupos de tripomastigotes del cultivo *In Vitro* que no recibieron un tratamiento con droga, fueron observadas a las 48 horas. Los flagelados mostraron estructuras de núcleo, flagelo y red de microtúbulos sub-peliculares, en orden con lo observado anteriormente en las infecciones experimentales (Figura 16). Además se pudo distinguir fácilmente el cinetoplasto y la mitocondria (Figura 16a); la mitocondria en estos parásitos desempeña un papel metabólico importante, incluyendo etapas del desarrollo fundamentalmente glucolíticas (Hannaert et al. 2003). Van Hellemon et al. (1998), afirman que la mitocondria de los tripanosomas, además de contener las enzimas del ciclo de Krebs, alberga un ciclo acetato-transferasa succinato-CoA que también está implicado en la generación de ATP.

Los grupos con tratamiento de 25 μM de droga, mostraron diferencias ultraestructurales entre aquellos a los que no se les dio un tratamiento con Pamidronato. Estas diferencias incluyen zonas electrón transparentes dentro del citoplasma del parásito (Figuras 17 a, b y d), además de formación de vacuolas no visibles anteriormente en otros tratamientos. En el caso de los grupos con tratamientos a una concentraciones de 50 μM , se observó igualmente progresiva extracción del contenido del citoplasma (Figuras b y c), así como además engrosamiento de la envoltura nuclear (Figura 18a). Finalmente al llegar a añadir a los grupos una concentración de 75 μM , la formación de vesículas a lo largo del citoplasma fue evidente (Figura 19d), en conjunto con mayor extracción proteica del contenido del citoplasma (Figura 19c), y la aparición de las estructuras antes mencionados (infecciones *In Vivo*) donde el citoesqueleto y la estructura de los organelos se han perdido (Figuras 19 a y b).

Es importante resaltar, para analizar estos resultados, el funcionamiento del Pamidronato y los bisfosfonatos en general. El pirofosfato es más abundante que el ATP en los tripanosomas y se encuentra parcialmente localizado en los acidocalcisomas, así se conoce que análogos de pirofosfato inhiben la proliferación de estos parásitos (Urbina *et al.* 1999). La inhibición de la proliferación que se observa en las curvas de parasitemia tanto en los experimentos *In Vivo* como *In Vitro*, se debe a que los bisfosfonatos son análogos del pirofosfato, siendo su sitio de acción específico la inhibición de la enzima Farnesyl Pirofosfato Sintasa (FPPS) (Overhand *et al.* 1998). Esta inhibición resulta en un déficit de la producción de pirofosfato, lo que lleva a un desequilibrio osmótico y energético importante, que compromete la sobrevivencia del parásito (Martin *et al.*, 2001).

Habiendo observado efectos de la droga, no solo a nivel de la Parasitemia sino también a nivel morfométrico y ultraestructural, es fácil concluir que la misma sí está ocasionando procesos de muerte celular en los tripomastigotes tratados, como consecuencia del desequilibrio osmótico y energético. Probablemente y como lo mencionamos anteriormente, los efectos morfológicos ocasionados por este tratamiento se solapan con aquellos ocasionados por el sistema inmune y la densidad poblacional en una infección en murinos, siendo en consecuencia más distinguibles en los cultivos *In Vitro*.

Finalmente es importante concluir que las características morfológicas observadas en los tripomastigotes tratados con droga no nos permiten asegurar un tipo particular de muerte celular específico. Sin embargo, llama la atención la formación de vacuolas y vesículas en el citoplasma no observadas en otras micrografías. Esta característica particular ha sido asociada a patrones morfológicos de la autofagia (Kroemer et al. 2009).

IV. Análisis Molecular

La utilización de técnicas moleculares para el estudio de procesos de muerte celular es ampliamente conocida. La formación de fragmentos oligonucleosomales a partir del ADN genómico, es una característica de muerte celular programada en organismos multicelulares (Lee *et al.* 2002).

Entre los Kinetoplastidas existen estudios que han mostrado degradación del ADN en “escalera”, aunque no muy pronunciado, y compactación de la cromatina inducidos en procesos de muerte celular (Zanger *et al.* 2002). Es por ello que la búsqueda de este tipo de patrones representa una ventaja a la hora de estudiar dichos procesos.

Al purificar el ADN genómico de cada grupo utilizado encontramos ciertas particularidades. En el caso de los cultivos *In Vitro*, el ADN genómico del control a las 24 horas se mostró bastante íntegro, sin embargo, al llegar a las 48 horas se hace visible un cambio en el que se puede suponer una pequeña degradación del contenido genómico de este grupo (Figura 24, primeros dos carriles). Al iniciar los tratamientos con droga es fácilmente distinguible la degradación del ADN genómico progresivo con el aumento de las concentraciones de Pamidronato; en las dos concentraciones más altas (75 y 100 μ M), la formación de dos fragmentos es bastante clara mostrando un visible comprometimiento de la integridad del ADN de estos grupos (Figura 24, carriles: 3, 4, 5 y 6).

Los experimentos *In Vivo* reflejan un mantenimiento de la integridad del ADN en aquellos puntos en los que, aún con tratamiento de la droga, se mantiene baja la Parasitemia (Figura 24, carriles: 24, 7, 8, 11 y 12). Llama la atención cómo en ambos aislados al incrementar la

parasitemia se puede observar un pequeño “smear” ó “chorreado”, esto puede estar relacionado con una posible degradación del ADN genómico en estos puntos de la infección experimental (Figura 24, carriles: 9, 10, 13 y 14).

Vale la pena resaltar que si existe una degradación del ADN genómico *In Vivo* o *In Vitro* sin tratamiento, puede estar reflejando la acción de una endonucleasa intrínseca del parásito (Zanger *et al.* 2002). Es recomendable en estos casos proseguir con la comparación entre ADN genómico por sí solo e incubado con alguna nucleasa exógena conocida.

Si bien nuestros resultados no mostraron el ADN en escalera, característico de muerte celular programada en organismos multicelulares, la integridad del mismo sí fue comprometida, no sólo por la utilización de drogas, sino también por el incremento en la densidad poblacional.

La detección de estas alteraciones a nivel molecular corroboran las obtenidas a nivel ultraestructural; por lo que el bienestar del parásito está siendo comprometido no sólo morfológicamente sino también genómicamente.

Habiendo analizado los resultados que presentan estos dos aislados de *Trypanosoma evansi*, desde las características más generales a las más finas, hemos podido diferenciar particularidades en la forma en la que estos parásitos unicelulares entran en procesos que llevan a una muerte celular. Si bien a niveles generales (estudios parasitológicos y morfométricos) la diferenciación resulta poco visible, son estas primeras características la base que soporta los análisis más finos (análisis ultraestructurales y moleculares).

De este modo se pudo distinguir características que se asocian a patrones de muerte celular específicos como necrosis, apoptosis y una posible autofagia. Y aunque más estudios son requeridos para confirmar estas características obtenidas, nuestros resultados abren una primera puerta hacia el hecho de que *Trypanosoma evansi* posee particularidades de diferentes tipos de muerte celular.

CONCLUSIONES

- El comportamiento de los aislados de “Teva1” y “El Mantecal” empleados en el estudio, expresan características aislado-específicas. En las infecciones experimentales el aislado “Teva1” presenta marcadas diferencias con el aislado “El Mantecal” en cuanto al tiempo de prepatencia, la sobrevivencia de los animales y el desarrollo temporal de la parasitemia. Por su parte en los experimentos *In Vitro*, el aislado “Teva1” es diferente al aislado “El Mantecal”, ya que este último no logró adaptarse al medio de cultivo, mientras que “Teva1” creció exponencialmente en él.
- El uso de Pamidronato en los experimentos *In Vivo* e *In Vitro* produce una disminución en la parasitemia. Esta disminución es estadísticamente significativa sólo en los experimentos *In Vitro*.
- Las características mesurables (A y LC) de los aislados de *Trypanosoma evansi* cambian a lo largo del tiempo con patrones aislado-específicos, no obstante el uso de Pamidronato produce una disminución de estas variables de forma similar en ambos aislados.
- Los cambios morfométricos en los experimentos *In Vitro* son estadísticamente significativos a lo largo de las horas del cultivo. El uso del Pamidronato produce una disminución de las variables medidas inversamente proporcional a la concentración de la droga.
- Los procesos de muerte celular inducidos por altas densidades poblacionales y el uso de Pamidronato se manifiestan de forma diferentes en ambos aislados. En el aislado “El Mantecal” las alteraciones ultraestructurales están mostraron empaquetamiento de la cromatina, hinchamiento de la mitocondria y pérdida de la doble membrana así como pérdida de la integridad de la membrana fagocitación por parte de células del sistema inmune. Por su parte en el aislado “Teva1” no fueron encontradas alteraciones ultraestructurales asociables a los procesos de muerte hallados en “El Mantecal”.

- El uso de Pamidronato en las infecciones experimentales y en los cultivos *In Vitro* produce respuestas diferentes. En el cultivo *In Vitro* las alteraciones ultraestructurales incluyeron extracción del contenido citoplasmático, pérdida de la estructura organelar y formación de vacuolas y vesículas en el citoplasma; en las infecciones experimentales este tipo de alteraciones no fueron observadas.
- La integridad del ADN genómico de las infecciones experimentales en ambos aislados, presentó degradación en los puntos altos de parasitemia. Por su parte en los cultivos *In Vitro* la mayor degradación del ADN genómico fue en las concentraciones altas de droga.

BIBLIOGRAFÍA

1. Abbas A., Lichtman, A., Pillai, S. 2000. *Inmunología Celular y Molecular*. Cuarta Edición. Madrid, España.
2. Ackerman, SJ., Loegering, D., Gleich, G. 1980. The human Charcot-Leyden crystal protein. Biochemical characteristics and measurement by radioimmunoassay. *J. Immunol.* **125**: 2118-2126
3. Algranati, D., Serra, M., Carrillo, C., González, N. 2006. Biología molecular del metabolismo de poliaminas en parásitos tripanosomátidos. Expresión de genes heterólogos de ornitina y arginina descarboxilasa en *Trypanosoma cruzi*. *Rev. Quim. Viva*, **2**: 78-94.
4. Ameisen, J.C.. 2002. On the origin, evolution, and nature of programmed cell death: a timeline of four billion years. *Cell Death Differ.* **9**: 367-393.
5. Ameisen, J.C., Idziorek, T., Billaut-Mulot, O., Loyens, M., Tissier, J.P., Potentier, A., Ouaissi, A. 1995. Apoptosis in a unicellular eukaryote (*Trypanosoma cruzi*). Implication for the evolutionary origin and role of programmed cell death in the control of cell proliferation, differentiation and survival. *Cell Death Differ.***2**: 35-53.
6. Arborgh, B., Bell, P., Brunk, U., Collins, V.P. 1976. The osmotic effect of glutaraldehyde during fixation. A transmission electron microscopy, scanning electron microscopy and cytochemical study. *J.Ultra. Rese.*, **56**: 339-350.
7. Arias, J.F., García F., Rivera, M., Lopez, R. 1997. *Trypanosoma evansi* in capybara from Venezuela. *J. Wild life Dis.*, **33**: 359-361.
8. Baehrecke EH. 2005. Autophagy: dual roles in life and death?. *Nat Rev Mol Cell Biol.* **6**: 505-510.
9. Baltz, T., Baltz, D., Giroud, C., Crockett, J. 1985. Cultivation in a semi-defined medium of animal infective forms of *Trypanosoma brucei*, *T. equiperdum*, *T. evansi*, *T. rhodesiense* *T. gambiense*. *EMBO*, **4**: 1273- 1277.

10. Boid, R., El-Amin, E.A., Mahmoud, M.M., Luckins, A.G. 1981. *Trypanosoma evansi* infections and antibodies in goats, sheep and camels in the Sudan. *Trop. Ani. Heal. Prod.*, **13**: 141-146.
11. Bozzola, J.J., Russell, L.D. 1992. Electron Microscopy. Principles and techniques for biologist. *Jones Bartlett Pub Sudbury, Massachusetts, United States*.
12. Brener, Z. 1962. Therapeutic activity and criterion of cure on mice experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, **4**: 389-396.
13. Brun, R., Hecker, H., Lun, Z-H. 1998. *Trypanosoma evansi* and *T. equiperdum*: distribution, biology, treatment and phylogenetic relationship (a review). *Vet. Parasitology*, **79**: 95-107.
14. Brusca, R., Brusca, G. 2003. Invertebrates. Sinauer Associates, Second Edition, Sunderland, Massachusetts, E.U.A.
15. Brown, A.B., Febiger, L. 1993. Hematology: principles and prodedures, Sexta Edición, Filadelfia, United States.
16. Canelón, J.L., Meléndez, R. 2003. Posible origen del *Trypanosoma evansi* en Venezuela. *Vet. Trop.* **28**: 155-167.
17. Casadevall A, Pirofsky L. 2001. Host-pathogen interactions: the attributes of virulence. *J Infect Dis.* **184**: 337-344.
18. Castro, J., Montalto, M., Bartel, L., Rodríguez, C. 2008. Efectos laterales tóxicos de los farmacos usados para el tratamiento de la enfermedad de Chagas (Tripanosomiasis americana). Un problema recurrente en el tratamiento de las enfermedades tropicales. *Bol. Asoc. Toxicol. Arg.*, **80**: 24-35.
19. Clarke, A.R., Purdie, C.A., Harrison, D.J., Morris, R.G., Bird, C.C., Hooper, M.L., Willie, A.H. 1993. Thymocyte apoptosis induced by P53-dependent and independent pathways. *Nature.* **362**: 849-852.
20. Cross, G.A.M. 1996. Antigenic Variation in trypanosomes: Secrets surface slowly. *BioEssays.* **18**: 283-291.
21. Cohen GM. 1997. Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochem J.* **326**: 1-16.
22. Corado, JA. Inmunología Actual. Primera Edición. 2003. Valencia, Venezuela.

23. Dávila, A.M.R., Ramirez, L., Silava, R.A.M.S. 1998. Biometrical alterations of *Trypanosoma evansi* isolate in laboratory rodents. *Vet. Parasitology*, **76**: 149-152.
24. Debrabant, A., Lee, Nancy., Bertholet, S., Duncan, R., Nakhasi, H. 2002. Programmed cell death in trypanosomatids and other unicellular organisms. *Int. J. Parasitol.* **33**: 257-267.
25. Debrabant, A., Nakhasi, H. 2003. Programmed cell death in trypanosomatids: is it an altruistic mechanism for survival of the fittest?. *Kinetoplastid Biol. Disease.* **2**:7.
26. De Graaf AO, van den Heuvel LP, Dijkman HB, de Abreu RA, Birkenkamp KU, de Witte T et al. 2004. Bcl-2 prevents loss of mitochondria in CCCP-induced apoptosis. *Exp Cell Res.* **299**: 533–540.
27. De Souza, E.M., Araujo-Jorge, T.C., Baili, C., Lansiaux, A., Batista, M.M., Oliveira, G.M. 2003. Host and parasite apoptosis following *Trypanosoma cruzi* infection in *in vitro* and *in vivo* models. *Cell tissue Rese.* **314**: 223-235
28. De Souza, E.M., Menna-Barreto, R., Araújo-Jorge, T., Kumar, A., Hu, Q., Boykin, D., Soeiro, M.N. 2006. Antiparasitic activity of aromatic diamidines is related to apoptosis-like death in *Trypanosoma cruzi*. *Parasitolog.* **133**: 75-79.
29. De Souza, W. 1984. Cell Biology of *Trypanosoma cruzi*. *Inter. Rev. of Cyto.* **86**: 197-283.
30. De Souza, E.M., Nefertiti, A.S.G., Baily, C., Lanciaux, A., Soerio, M.N.C. 2010. Differential apoptosis-like cell death in amastigote and tripomastigote forms from *Trypanosoma cruzi*-infected heart cells in vitro. *Cell Tissue Res.* **341**: 173-180.
31. De Souza, W. 2008. Electron microscopy of tripanosomes-A historical view. *Mem. Inst Oswaldo Cruz.* **103**: 313-325.
32. Docampo, R. 2008. Estructura y función de los acidocalcisomas. *Menj. Bioq.* **32**: 11-X.
33. Docampo, R., Moreno, S. N. 1999. Acidocalcisome: a novel Ca⁺² storage compartment in Trypanosomatids and Apicomplexan parasites. *Parasitology*, **15**: 443-48.
34. Docampo R., 2001. Recent developments in the chemotherapy of Chagas' disease. *Curr Pharm Des* 7(12): 1157-64.

35. Doukoumetzidis K, Hengartner MO. 2008. Cell biology: dying to hold you. *Nature*. **451**: 530–531.
36. Duszenko, M., Figarella, K., Macleod, E., Welburn, S. 2006. Death of a trypanosome: a selfish altruism. *TRENDS Parasitol*, **22**: 536-542.
37. Elias, M.C., Marques-Porto, R., Freymuller, E., Schenckman, S. 2001. Transcription rate modulation through the *Trypanosoma cruzi* life cycle occurs in parallel with changes in nuclear organization. *Mol. Bioch. Parasitology*, **112**: 79-90.
38. Fang, J., Beattie, D.S. 2003. Alternative oxidative present in procyclic *Trypanosoma brucei* may act to lower mitochondrial production of superoxide. *Arch. Biochem. Biophys.* **414**: 294-302.
39. Farina, M., Attias, M., Souto-Padron, T., De Souza, W. 1986. Further studies on the organization of the paraxial rod of trypanosomatids. *J Protozool*, **33**: 552-557.
40. Fernandes-Alnemri T, Wu J, Yu JW, Datta P, Miller B, Jankowski W et al. 2007. The pyroptosome: a supramolecular assembly of ASC dimers mediating inflammatory cell death via caspase-1 activation. *Cell Death Differ.* **14**: 1590–1604.
41. Figarella, K., Rawer, M., Uzcategui, N., Kubata, B., Lauber, K., Madeo, F., Wesselborg, S., Duszenko, M. 2005. Prostaglandin D₂ induces programmed cell death in *Trypanosoma brucei* bloodstream form. *Cell Death Differ.* **1**: 12.
42. Figuerella, K., Uzcategui, N.L., Beck, A., Shoenfeld, C., Kubata, BK., Lang, F., Duszenko, M. 2006. Prostaglandin-induced programmed cell death in *Trypanosoma brucei* involves oxidative stress. *Cell death diff.* **13**: 1802-1814.
43. Fink, S., Cookson, B. 2005. Apoptosis, Pyroptosis, and Necrosis: Mechanistic Description of Dead and Dying Eukaryotic Cells. *Infec. Immunity.* **73**: 1907-1916.
44. Fink SL, Bergsbaken T, Cookson BT. 2008. Anthrax lethal toxin and Salmonella elicit the common cell death pathway of caspase-1-dependent pyroptosis via distinct mechanisms. *Proc Natl Acad Sci.* **105**: 4312–4317.
45. Finol, H.J., Boada–Sucre, A., Rossi, M., Tejero, F. 2001. Skeletal muscle ultrastructural pathology in mice infected with *Trypanosoma evansi*. *Jour. of Sub. Cyto. Pathology*, **33**: 65-71.
46. Franke, C.R.; Greiner, M., Mehlitz, D. 1994. Investigation on naturally occurring *Trypanosoma evansi* infections in horses, cattle, dogs and capybaras (*Hydrochaeris*

- hydrochaeris*) in Pantanal de Poconé (MatoGrosso, Brazil). *Acta Trop.*, **58**: 159-169.
47. Fuqua, C., Greenberg, E.P. 2002. Listening in on bacteria: acyl-homoserine lactone signaling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **3**, 685-695.
 48. Gardiner, C.H., Fayer, R., Dubey, J.P. 1988. An atlas of protozoan parasites in animal tissues. U.S. Department of Agriculture Handbook #651: Washington D.C.
 49. Garrido C, Kroemer G. 2004. Life's smile, death's grin: vital functions of apoptosis-executing proteins. *Curr Opin Cell Biol.* **16**: 639–646.
 50. Gibson, W.C., Parr, C.W., Swincelhurst, C.A., Welch, S.G. 1978. A comparison of the isoenzymes, soluble proteins, polypeptides and free aminoacids from isolates of *Trypanosoma evansi*. *Comp.e Bioch. and Phy.* **60B**: 137-142.
 51. Gilmore AP. 2005. Anoikis. *Cell Death Differ.* **12**: 1473–1477.
 52. Godman G., 1990. Bases farmacológicas de la terapéutica. Editorial Medica Panamericana, Buenos Aires.
 53. Golstein P, Kroemer G. 2007. Cell death by necrosis: towards a molecular definition. *Trends Biochem Sci.* **32**: 37–43.
 54. Green D, Kroemer G. 1998. The central executioners of apoptosis: caspases or mitochondria?. *Trends Cell Biol.* **8**: 267–271.
 55. Green DR, Kroemer G. 2004. The pathophysiology of mitochondrial cell death. *Science.* **305**: 626–629.
 56. Grossmann J. 2002. Molecular mechanisms of ‘detachment-induced apoptosis—Anoikis’. *Apoptosis.* **7**: 247–260.
 57. Hannaert, V., Bringaud, F., Opperdoes, F.R. y Michels, P.A. 2003. Evolution of energy metabolism and its compartmentation in Kinetoplastida. *Kinetoplastid Biol Dis* **2**: 11.
 58. Herrera, H.M., Alessi, A.C., Marques, L.C., Santana, A.E., Aquino, L.P.C.T., Menezes, R.F., Moraes, M.A.V., Machado, R.Z. 2002. Experimental *Trypanosoma evansi* infection in South American Coati (*Nasua nasua*): Haematological, biochemical and histopathological changes. *Acta Trop.*, **81**: 203-210.

59. Hesse, F., Selzer, P.M., Muhlstadt, K., Duszenko, M. 1995. A novel cultivation technique for long term maintenance of bloodstream from trypanosomes *in vitro*. *Mol. Bioq. Parasitol.* **70**: 157-166.
60. Hoare, C.A. 1956. Morphological and taxonomic studies on mammalian trypanosomes. VIII. Revision of *Trypanosoma evansi*. *Parasitology*, **46**: 130-172.
61. Hoare, C.A. 1964. Morphological and taxonomic studies on mammalian trypanosomes. X. Revision of the systematics. *J. Protozoology*, **11**: 200-207.
62. Hoare, C. A. 1972. The Trypanosomes of Mammals. A Zoological Monograph. Blackwell Scientific Publications: Oxford, England.
63. Joshi, P., Shegokar, V., Powar, R., Herder, S., Katti, R., Salkar, H., Dani, V., Bhargava, A., Jannin, J., Truc, P. 2005. Human trypanosomiasis caused by *Trypanosoma evansi* in India: the first case report. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **73**: 491-495
64. Kanduc, D., Mittelman, A., Serpico, R., Sinigaglia, E., Sinha, A., Natale, C., Santacroce, R., Di Corcia, M., Lucchese, A., Dini, L., Pami, P., Santacroce, S., Simone, S., Bucci, R., Farber, E. 2002. Cell death: Apoptosis versus necrosis. *Int. J. Onco.* **21**: 165-170.
65. Kassai, T., Cordero, M., Euzéby, J., Gaafar, S., Hiepe, Th., Himonas, CA. 1988. Standardized Nomenclature of Animal Parasitic Diseases. *Vet. Parasitol.* **29**: 299-326.
66. Kroemer G, Galluzzi L, Brenner C. 2007. Mitochondrial membrane permeabilization in cell death. *Physiol Rev.* **87**: 99-163.
67. Kroemer, G., Galluzzi, L., Vandenabeele, P., Abrams, J., Alnemri, E.S., Baehrecke, E.H., Blagosklonny, M.V. y colaboradores. 2009. Classification of cell death : recommendations of the Nomenclature Committe on Cell Death 2009. *Cell Death Differ.* **16** : 3-11
68. Kumar S. 2007. Caspase function in programmed cell death. *Cell Death Differ.* **14**: 32-43.
69. Labbe K, Saleh M. 2008. Cell death in the host response to infection. *Cell Death Differ.* **15**: 1339-1349.

70. Lanham, S.M., Godfrey, D.G. 1970. Isolation of salivarian trypanosomes from man and other mammals using DEAE cellulose. *Exp Parasitology*. **28**: 521–534.
71. Lavier, G. 1929. Note sur *Trypanosoma venezuelense* Mesnil, 1910. *Comp. Rend. de la Soc. de Bio.* **101**: 833-835.
72. Lee, N., Bertholet, N., Debrabant, A., Muller, J., Duncan, R., Nakhasi, H. 2002. Programmed cell death in the unicellular protozoan parasite *Leishmania*. *Cell Death Diff.* **9** : 53-64.
73. Legendre, P., Legendre, D. 2003. The basis for clustering and ordination. *Num. Ecol.* **7**: 247-248.
74. Leger, M., Tejera, E. 1920. Contribution a le etude de *Trypanosoma venezuelense*, Mesnil, 1910. *Bulle. de la Soc. de Patho. Exo.* **13**: 576-588.
75. Levine B, Yuan J. 2005. Autophagy in cell death: an innocent convict?. *J Clin Invest.* **115**: 2679–2688.
76. Lewis, K. 2000. Programmed death in bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **64**: 503-514.
77. Lippens S, Denecker G, Ovaere P, Vandenabeele P, Declercq W. 2005. Death penalty for keratinocytes: apoptosis versus cornification. *Cell Death Differ.* **12**: 1497–1508.
78. Losos, G.J. 1980. Diseases caused by *Trypanosoma evansi*. A review. *Vet. Rese. Commu.* **4**: 165-181.
79. Luckins, A.G. 1988. *Trypanosoma evansi* in Asia. *Parasitol. Today.* **5**: 137-142.
80. Luft, J. 1961. Improvements of epoxy resin embedding methods. *J. Bioph. Bioch. Cyto.* **9**: 409-414.
81. Lun, Z.R., Fang, Y., Wang, C.J., Brun, R. 1993. Trypanosomiasis of domestic animals in China. *Parasitol. Today.* **2**: 41-45.
82. Luo L, O’Leary DD. 2005. Axon retraction and degeneration in development and disease. *Annu Rev Neurosci.* **28**: 127–156.
83. Mahmoud, M.M., Gray, A.R. 1980. Trypanosomiasis due to *Trypanosoma evansi* (Steel, 1885) Balbiani, 1888. A review of recent research. *Trop. Ani. Health and Produ.* **12**: 35-47.

84. Manjo, G. y Joris, I. 1995. Apoptosis, Oncosis and Necrosis. *American J. Patho.* **146**: 3-15.
85. Martin, M.B., Grimley, J.S., Lewis, J.C., Health, H.T., Bailey, B.N., Kendrick, H., Yardley, y col. 2001. Bisphosphonates inhibit the growth of *Trypanosome brucei*, *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania donovani*, *Toxoplasma gondii* and *Plasmodium falciparum*: a potencial route to chemotherapy. *J. Med. Chem.* **44**: 909-916.
86. Mendoza M., Mijares A., Rojas H., Rodriguez J.P., Urbina A., DiPolo R., 2002. Physiological and morphological evidences for the presence acidocalcisomes in *Trypanosoma evansi*: single cell fluorescence and 31P NMR studies. *Mol Biochem Parasitol* 125(1-2): 23-33.
87. Menna-Barreto, R., Salomao, K., Dantas, A., Santa-Rita, R., Soares, M., Barbosa, H., Castro, S. 2009. Different cell death pathways induced by drugs in *Trypanosoma cruzi*: An ultrastructural study. *Micron.* **40**: 157-168.
88. Mesnil, F. 1910. Identification de quelques trypanosomes pathogenes. *Bull. de la Soci. de Patho. Exo.* **3**: 376-386.
89. Milton, J.S. 2001. Estadística para Biología y Ciencias de la salud. Mc Graw-Hill Internamericana, Madrid.
90. Mingone, L.E. 1910. Le role des carpinchos comme reservoir de virus dans la conservation du mal de caderas. *Bull. de la Soc. de Pathol. Exo.* **3**: 524-525.
91. Montalvetti, A., Bailey, B.N., Martin, M.B., Severin, G.W., Oldfield, E., Docampo, R. 2001. Bisphosphonates are potent inhibitors of *Trypanosoma cruzi* farmesyl pyrophosphatasa synthasa. *J. Bio. Chem.* **278**: 17075-17083.
92. Morales, G.A., Wells, E.A., Angel, D. 1976. The capybara (*Hydrochoerus hydrochoeris*) as a reservoir host for *Trypanosoma evansi*. *J. Wild. Dise.* **12**: 572-574.
93. Moreira, M.E., Del Portillo, H.A., Milder, R.V., Balanco, J.M, Barcinski, M.A. 1995. Heat shock induction of apoptosis in promastigotes of the uicellular organism *Leishmania amazonensis*. *J. Cell. Phy.* **167**: 305-313.
94. Neufeld TP, Baehrecke EH. 2008. Eating on the fly: function and regulation of autophagy during cell growth, survival and death in *Drosophila*. *Autophagy.* **4**: 557-562.

95. Nguewa, P., Fuertes, M., Valladares, B., Alonso, C., Pérez, J. 2004. Programmed cell death in trypanosomatids: a way to maximize their biological fitness?. *TRENDS Parasitol.* **20**: 375-380.
96. Nunes, V.L.B., Oshiro, E.T. 1990. *Trypanosoma (Trypanozoon) evansi* in the coati from the Pantanal region of Matto Grosso do Sul State, Brazil. *Trans. of Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* **84**:692.
97. Opperdoes, FR., Borst, P. 1977. Localization of nine glycolytic enzymes in a microbody-like organelle in *Trypanosoma brucei*. *FEBS Lett*, **80**: 360-364.
98. Orrenius S, Zhivotovsky B, Nicotera P. 2003. Regulation of cell death: the calcium-apoptosis link. *Nat Rev Mol Cell Biol.* **4**: 552–565.
99. Ouaiissi, A. 2003. Apoptosis-like death in trypanosomatids: search for putative pathways and genes involved. *Kinetoplastid Biol. Dis.* **2**: 5.
100. Overhand, M., Stuivenberg, H. R., Pieterman, E., Cohen, L. H., van Leeuwen, R. E. W., Valentijn, A. R. P. M., Overkleeft y colaboradores. 1998. Inhibitors of Protein:Farnesyl Transferase and Protein:Geranylgeranyl Transferase I: Synthesis of Homologous Diphosphonate Analogs of Isoprenylated Pyrophosphate *Bioorg. Chem.* **26**, 269–282.
101. Overholtzer M, Mailleux AA, Mouneimne G, Normand G, Schnitt SJ, King RW et al. 2007. A nonapoptotic cell death process, entosis, that occurs by cell-in-cell invasion. *Cell.* **131**: 966–979.
102. Palkova, Z. 1997. Ammonia mediates communication between yeast colonies. *Nature*, **390**: 532-536.
103. Palau, M.T. 2000. Relación hospedero-parásito *Trypanosoma cruzi*. *MVZ-Cordoba.* **5**: 33-37.
104. Peña G., 2000. Enfermedades Exóticas de los Animales. Editorial Instituto interamericano de cooperación para la agricultura. Estados Unidos, Virginia.
105. Perrone, T. 2003. Tipificación de aislados venezolanos de *Trypanosoma evansi*. Tesis de Doctorado, Universidad Simón Bolívar, Caracas, Venezuela.
106. Perrone, T., Fernández, D., González-Baradat, B., Eleizalde, M., González-Marcano, E., Mendoza, M. 2009. *Trypanosoma evansi*: A comparison of PCR and

- parasitological diagnostic tests in experimentally infected mice. *Exp. Pathol.* **121**: 1-7.
107. Perrone, T.M., Garrizzo, J., Roschman-González, A., Tejero, F., Escalante, A., Aso, P.M. 2006. Susceptibility of different mouse strains to experimental infections with a Venezuelan isolate of *Trypanosoma evansi*. *J. Protozoology Rese.* **16**: 1-8.
108. Poulin, R., Combes, C. 1999. The concept of virulence: interpretations and implications. *Parasitol. Today.* **15**: 474-475.
109. Quiñones-Mateu, M.E., Finol, H.J., Sucre, L.E., Torres, S.H. 1994. Muscular changes in venezuelan wild horses naturally infected with *Trypanosoma evansi*. *J. Comp. Pathol.* **220**: 79-89.
110. Quiroz, H. 2005. Parasitología y enfermedades parasitarias de animales domésticos. Primera edición. México.
111. Raff, M. C. 1992. Social control on cell-survival and cell-death. *Nature.* **356**: 397-400.
112. Raff MC, Whitmore AV, Finn JT. 2002. Axonal self-destruction and neurodegeneration. *Science.* **296**: 868-871.
113. Rangel, R. 1905. Nota preliminar sobre la peste boba y la derrengadera de los équidos de los llanos de Venezuela (tripanosomiasis). *Gaceta Médica de Caracas*, **12**: 105-112.
114. Reynolds, E.S. 1963. The use of lead citrate at high pH as an electron opaque stain in electron microscopy. *Jour. of Cell Bio.* **17**: 208-212.
115. Rivera, M. 1996. Hemoparasitosis bovinas: tripanosomiasis. UCV-C.D.C.H: Caracas.
116. Rodriguez-Morales, A. 2005. Nuevas perspectivas en el manejo terapéutico de la enfermedad del Chagas. *Rev. Peruana de Med. Exp. y Sal.Púb.* **22**: 1726-4634.
117. Roninson IB, Broude EV, Chang BD. 2001. If not apoptosis, then what? Treatment-induced senescence and mitotic catastrophe in tumor cells. *Drug Resist Updat.* **4**: 303-313.

118. Gonzalez, R. 2010. Aproximación cuantitativa al análisis de la heterogeneidad de aislados venezolanos de *Trypanosoma evansi*. Tesis de Doctorado, Universidad Central de Venezuela, Caracas, Venezuela.
119. Rossi, M., Boada-Sucre, A., Finol, H.J., Tejero, F., Aso, A., Bello B., Hernández, G. 1999. Ultrastructural alterations in the adrenal gland cortex of mice experimentally infected with a Venezuelan isolate of *Trypanosoma evansi*. *Jour. of Submi. Cytol. Pathol.* **31**: 509-513.
120. Rossi, M., Boada-Sucre, A., Hernández, G., Bello, B., Finol, H.J., Payares-Trujillo, G., y Aso, P.M. 2008. Análisis ultraestructural del hígado en ratones infectados experimentalmente con un aislado venezolano del *Trypanosoma evansi*. *Acta micro.* **17**: 5-12.
121. Saldaña, C., Cordova, C., Ofelia, P., Vargas, V. 2006. Utilización de *Lepidium Peruvianum* Maca, como medio de cultivo para el crecimiento de *Trypanosoma Cruzi*. *Rev. Perú. med. exp. salud pública.* **23**:137-140.
122. Shaw, J.J. 1977. The epizootiology of American Surra with special reference to the Lower Amazon Region. *Protozoology*, **3**: 119-128.
123. Soeiro, M., De Souza, E. 2007. Programmed Cell Death & Trypanosomatids: A Brief Review. *Programmed Cell Death: From Protozoan Diseases to Human Cancers*, **5**: 200-215.
124. Solari, A.J. 1995. Mitosis and genome partition in trypanosomes. *Biocell*, **19**: 65-84.
125. Soti, C., Sreedhart, A., Csermely, P. 2003. Apoptosis, necrosis and cellular senescence: chaperone occupancy as a potential switch. *Aging Cell*, **2**: 39-45.
126. Sperandio S, de Belle I, Bredesen DE. 2000. An alternative, nonapoptotic form of programmed cell death. *Proc Natl Acad Sci.* **97**: 14376–14381.
127. Souto-Padron T., De Souza W., Heuser J.E. 1984. Quick-freeze, deepetchrotary replication of *Trypanosoma cruzi* and *Herpetomonas megaseliae*. *Jour. of Cell Sci.* **69**: 167-168.
128. Steinert, G., Firket, H., Steinert, M. 1958. Synthèse d'acide désoxyribonucléique dans le corps parabasal de *Trypanosoma mega*. *Exp Cell Res*, **15**: 632-635.

129. Tejera, E. 1920. Trypanosomiasis animals au Venezuela. *Bull. Soc. Patho. Exo.* **13**: 297-305,
130. Tejero, F., Arias-Mota, L.L., Roschman-González, A., Aso, P.M., Finol, H.J. 2010. *Trypanosoma evansi*: ultrastructural cardiac muscle and cardiac microvasculature changes in experimental murine infections. *Acta Sci. Vet.* **38**: 279-285.
131. Tejero F., Arispe, M. 1984. *Trypanosoma evansi*: *in vitro* serum dependent phagocytosis. *Rev. d'élevage et de med. Vét. dès pays trop.* **37**: 263-269.
132. Tejero, F., Brun, S., Roschman-Gonzalez, A., Perrone-Carmona, T.M., Aso, P.M., Velasco, E., Finol, H.J. 2009b. *Trypanosoma evansi*: Analysis of the ultrastructural change in hepatic cells during murine experimental infections. *Acta Micro.* **18**: 28-32.
133. Tejero, F., Brun, S., Roschman-Gonzalez, A., Velasco, E., Aso, P. M., Finol, H. 2009a. Ultraestructura renal en infecciones murinas experimentales con un aislado venezolano de *Trypanosoma evansi*. *INHRR.* **40**: 44-49.
134. Tejero, F.I, Roschman-González, A., Perrone-Carmona, T.M., Aso, P.M. 2008. *Trypanosoma evansi*: A quantitative approach to the understanding of the morphometry-hematology relationship throughout experimental murine infections. *J. Proto. Rese.* **18**: 34-47.
135. Ting JP, Willingham SB, Bergstralh DT. 2008. NLRs at the intersection of cell death and immunity. *Nat Rev Immunol.* **8**: 372–379.
136. Urbina, J.A., Moreno B., Vierkotter, S., Oldfield, E., Payares, G., Sanoja, C., Bailey, B.N., Tan, W., Scott, D.A., Moreno, S.N., Docampo, R. 1999. *Trypanosoma cruzi* contains major pyrophosphate stores, and its growth *in vitro* and *in vivo* is blocked by pyrophosphate analogs. *J. Bio. Chem.* **274**: 33609-33615.
137. Van Hellemond, J. J., Opperdoes, F. R. & Tielens, A. G. M. 1998. Trypanosomatidae produce acetate via a mitochondrial acetate:succinate CoA transferase. *Proc. Natl Acad. Sci.* **95**, 3036–3041.
138. Vanhollebeke, B., Truc, P., Poelvoorde, P., Pays, A., Joshi, P., Katti, R., Jannin, J. y Pays, E. 2006. Human *Trypanosoma evansi* Infection Linked to a Lack of Apolipoprotein L-I. *The New Engl. J. Med.* **355**: 2752-2756.

139. Vergel, M. 2007. Importancia de la especie del mamífero en la infección experimental por *Trypanosoma cruzi*. *Salus*. **11**: 15-19.
140. Vickerman, K. (1997). Landmarks in trypanosome research. En: Trypanosomiasis and Leishmaniasis (Hide, G., Mottram, J.C., Coombs, G.H. & Holmes, P.H., eds.). CAB International. Oxford.
141. Vakifahmetoglu H, Olsson M, Zhivotovsky B. 2008. Death through a tragedy: mitotic catastrophe. *Cell Death Differ*. **15**: 1153–1162.
142. Watson, M. L. 1958. Staining of tissue sections for electron microscopy with heavy metals. *J. Biophys. Biochem. Cyto.* **4**: 475-478.
143. Welburn, S.C., Dale, C., Ellis, D., Beecroft, R. & Paerson, T. W. 1996. Apoptosis in procyclic *Trypanosoma brucei rhodesiense* *in vitro*. *Cell Death Diff.* **3**: 229-236.
144. Welburn, S.C., Macleod, E., Figuerella, K. & Duzensko, M. 2006. Programmed cell death in African trypanosomes. *Parasitology Cambridge Univ. Press*, **132**: 7-18.
145. Yang MY, Chuang H, Chen RF, Yang KD. 2002. Reversible phosphatidylserine expression on blood granulocytes related to membrane perturbation but not DNA strand breaks. *J Leukoc Biol.* **71**: 231–237.
146. Zanger, H., Mottram, J.C., Fasel, N. 2002. Cell Death in Leishmania induced by stress and differentiation: programmed cell death or necrosis? *Cell Death Diff.* **9**: 1126-1139.