

SIMPOSIO SOBRE NUEVOS ENFOQUES EN LA INVESTIGACION DE LA TRIPANOSOMIASIS AMERICANA^{1,2}

Zigman Brener³

Durante el Simposio se examinaron aproximadamente 63 presentaciones verbales y documentos de información básica. De dichos trabajos se exponen a continuación las cuestiones fundamentales de la investigación de la enfermedad.

El *Trypanosoma cruzi*: variaciones intraespecíficas

Cada vez hay más pruebas de que el *T. cruzi* es realmente un complejo biológico de poblaciones parasitarias que circulan en la naturaleza entre los seres humanos, animales domésticos, reservorios salvajes y vectores selváticos o domiciliarios. Con el estudio de laboratorio de poblaciones parasitarias aisladas de fuentes conocidas se ha obtenido información fragmentaria. Estas cepas mostraron diferencias en las características morfológicas, curvas de parasitemia, índices de mortalidad, tropismo tisular, capacidad de destrucción neuronal, susceptibilidad a agentes quimioterapéuticos y tipos antigénicos. Puesto que algunas de estas características tienen rasgos evasivos, no pueden utilizarse como marcadores fidedignos para la identificación de cepas. Debido a que ciertas variaciones intraespecíficas pueden estar asociadas a diferencias en la estructura molecular de enzimas que muestran funciones bioquímicas comunes, la identificación de enzimas solubles mediante electroforesis (que puede detectar diferencias en las cargas eléctricas así como en el tamaño molecular) constituye probablemente un método muy prometedor para la identificación de cepas. En un trabajo preliminar (1)

en el que se utilizaron tres sistemas enzimáticos (glucosa-6-fosfato-dehidrogenasa, enzima málica, y fosfoglucoasa isomerasa) se obtuvieron resultados interesantes con 43 aislados cultivados del *T. cruzi*. Este método puede perfeccionarse mediante el estudio de la antigenicidad enzimática: con la doble difusión de las suspensiones de parásitos y antiseros, algunas líneas de precipitina retienen la actividad enzimática específica de sustratos y permiten identificar las cepas después de la tinción.

Otro método bioquímico—la determinación de la densidad flotante del ADN—se emplea como criterio taxonómico para los aislados de especies de *Leishmania*. Además, en los estudios del *T. cruzi*, se ha sugerido la utilización de esta técnica junto con la hibridización de ADN/ARN.

Estos refinados métodos tendrán un valor limitado para la caracterización de cepas del *T. cruzi* a menos que se lleven a cabo estudios con poblaciones parasitarias no mezcladas, de origen definido y conocido, conservadas en el laboratorio en condiciones estandarizadas y estrictas, y que se establezca provisionalmente una correlación entre el proceso de formación de subespecies (que según parece está ocurriendo en el *T. cruzi*), y los datos sobre la epidemiología y patogenicidad de la enfermedad de Chagas.

Debería fomentarse el desarrollo de métodos de criopreservación y "bancos de tripanosomas" en los que pudieran aislarse, caracterizarse y almacenarse cepas de *T. cruzi* a baja temperatura. También, con objeto de obtener aislados más homogéneos

¹ Publicado en inglés en *American Trypanosomiasis Research*. Organización Panamericana de la Salud, Publicación Científica 318, Washington, D.C. 1976, págs. 403-410.

² El Simposio tuvo lugar en Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil, del 18 al 21 de marzo de 1975.

³ Departamento de Parasitología, ICB, Universidade Federal de Minas Gerais e Centro de Pesquisas "René Rachou", Fio Cruz, Belo Horizonte, M.G., Brasil

en el laboratorio, deberían estimularse los estudios del comportamiento de poblaciones de clonas derivadas de formas únicas sanguíneas o de cultivo.

Métodos ecológicos para el estudio del *T. cruzi*

En una extensa zona del Continente Americano comprendida entre 42° latitud N en Estados Unidos y 43° latitud S en Argentina, se han detectado focos naturales de tripanosomiasis americana con reservorios salvajes infectados y vectores triatomíneos selváticos. Se ha hallado infección por tripanosomas de tipo *cruzi* en más de 100 especies de mamíferos de varios órdenes. Barretto (2) examinó la importancia del desplazamiento del *T. cruzi* de los focos naturales a biotopos artificiales y luego a un ciclo domiciliario de la enfermedad. La invasión de esos biotopos artificiales por vectores y mamíferos salvajes infectados, la conversión de los triatomíneos salvajes en especies domiciliarias en zonas recién penetradas por el hombre, el contacto temporal de los animales domésticos en focos naturales y la intrusión humana en focos naturales constituyen algunos de los mecanismos en virtud de los cuales el *T. cruzi* parece desplazarse del ciclo selvático al domiciliario. Avila-Pires (3) hizo referencia a los posibles riesgos de esta serie de acontecimientos en regiones, como la del Amazonas, recientemente ocupadas por el hombre. Los enormes cambios en el ambiente y la construcción de viviendas humanas, que favorecen la colonización del vector, pueden contribuir a la formación de microclimas propicios a la introducción en los hogares de especies vectoras locales o extrañas. La migración interna, con la consecuente llegada de personas infectadas a esas zonas, puede contribuir a crear nuevos focos domiciliarios de la enfermedad.

Se requieren métodos ecológicos nuevos y fidedignos para atrapar, marcar y obtener muestras de vectores sobre el terreno, a fin de estudiar la dispersión del insecto y trazar las

posibles corrientes de vectores entre ecotopos selváticos y domiciliarios. Asimismo, es indispensable cierto tipo de caracterización de aislados del *T. cruzi* para determinar el grado de superposición de los ciclos domésticos y selváticos y la tasa de introducción de cepas "salvajes" en el ciclo domiciliario. Miles (4) señaló la necesidad de realizar más estudios sobre los triatomíneos selváticos para determinar las especies que probablemente surgirán como importantes vectores domésticos del *T. cruzi*, y de esta manera establecerán nuevos focos domésticos a continuación de los programas de control.

Por otro lado, Rodrigues da Silva (5) describió la transformación gradual de la tripanosomiasis americana en enfermedad urbana a consecuencia de la migración interna a las grandes ciudades. Los estudios prospectivos de esos grupos de pacientes que habitan en zonas no endémicas pueden contribuir a la evaluación del papel que desempeña la reinfección en la patogenia de la enfermedad de Chagas.

Transmisión de la enfermedad de Chagas

En las zonas endémicas la enfermedad de Chagas se transmite fácilmente ante la presencia de personas susceptibles, vectores domiciliarios activos y parásitos viables. En otras regiones, como Estados Unidos y el Amazonas, la presencia de esos tres elementos del ciclo no implica necesariamente que exista enfermedad de Chagas humana; y prácticamente, el ciclo selvático es el único que se presenta. Ahora bien, por lo que toca a la transmisión, la enfermedad de Chagas va perdiendo poco a poco su rigurosa dependencia del vector y aumentando otros mecanismos tales como la transfusión de sangre y la enfermedad congénita.

Minter (6) y Zeledón (7) informaron sobre algunos aspectos de la transmisión vectorial que, hasta entonces, habían sido investigados solo en parte, a saber, los efectos del comportamiento del insecto sobre la transmisión del *T. cruzi*. Zeledón sugirió la posibilidad de

que existiera un gradiente de la relación hombre-insecto que empezaría con los insectos bien adaptados a las viviendas, pasaría por especies ocasionalmente halladas en las casas o sus inmediaciones pero incapaces de prosperar en ese medio y, por último, terminaría con los insectos totalmente salvajes.

Especies de vectores en el proceso evolutivo de adaptación al medio doméstico o peridoméstico y el transporte pasivo de especies sumamente adaptables pueden contribuir a la expansión de zonas endémicas y a la reinvasión de otras bajo control profiláctico. Minter (6) describió las preferencias con respecto al huésped y las características alimentarias del vector, obtenidas por la identificación de la ingestión de sangre.

Rabinovich y Rossell (8) presentaron un modelo matemático ecológico ("una copia imperfecta del mundo real") para estudiar los posibles conductos por los que el *T. cruzi* llega al hombre y las características principales de la transmisión de la enfermedad de Chagas. Este modelo se basaría en parámetros tales como el número de vectores que puede sostener un huésped, el número de picaduras de insectos y la tasa de aumento natural del vector. El modelo simplificado simulaba una casa habitada por un número definido de personas y animales domésticos infectados y no infectados, además de insectos no infectados, e incluía la posibilidad de migración de la población salvaje (reservorios y vectores) hacia la casa.

En orden de importancia, la transfusión de sangre constituye el segundo modo de transmisión de la enfermedad de Chagas, tanto en las zonas endémicas como en las no endémicas. A este respecto probablemente existe una relación con la transformación gradual mencionada de la tripanosomiasis americana en una enfermedad urbana. En ciertas zonas endémicas la prevalencia de enfermedad de Chagas entre los posibles donadores de sangre ha llegado hasta el 20%, dándose el caso de que los pacientes que recibieron sangre de donantes chagásicos se infectaron en una proporción del 10 al 20%, aproxi-

madamente. Las personas infectadas de esta manera alcanzaron del 50 al 60% en series de pacientes hemofílicos sometidos a transfusiones repetidas en zonas endémicas. El hecho de que en São Paulo se efectúen alrededor de 500,000 transfusiones de sangre cada año da una idea de la importancia del problema: si el 2% de la sangre resultara positiva respecto a la enfermedad de Chagas, se obtendrían 10,000 muestras de sangre potencialmente capaces de transmitir la enfermedad. Dicha transmisión debería prevenirse por el examen minucioso de presuntos donadores, o bien mediante la esterilización por medicamentos activos (9). Se han obtenido buenos resultados con la adición de violeta de genciana a la sangre almacenada en los bancos, pero todavía quedan por utilizarse nuevas drogas incoloras, solubles, atóxicas, económicas y profilácticas. Dichos medicamentos podrían obtenerse mediante extensos programas específicos de selección encaminados a encontrar agentes activos contra las formas sanguíneas.

En estos últimos años las publicaciones pediátricas y parasitológicas han informado sobre más de 100 casos de enfermedad de Chagas congénita (la mitad de ellos en Chile). Esta cifra probablemente no representa el número real de casos que ocurren en las zonas endémicas. A menudo los recién nacidos infectados presentan una forma grave de la enfermedad con parasitemia y, si no se tratan, acusan una elevada mortalidad. Se deberían llevar a cabo estudios prospectivos y cooperativos en zonas endémicas mediante el examen de sangre y la detección por inmunofluorescencia de anticuerpos específicos IgM. También habría que establecer un registro internacional y una vigilancia ulterior a largo plazo a fin de determinar la posibilidad de retraso mental e incapacidades del aprendizaje en los casos congénitos.

Diagnóstico

La infección crónica por *T. cruzi* puede diagnosticarse por medio de una serie de

pruebas serológicas (fijación del complemento, inmunofluorescencia, hemaglutinación), las que han sido evaluadas comparativamente por Camargo (9). Sin embargo, la falta de estandarización conducirá a considerables variaciones en la sensibilidad y especificidad de las pruebas. En este sentido se recomendó en el Simposio practicar estudios sobre composición de extractos antigénicos, caracterización antigénica de cepas diferentes y fases distintas de desarrollo, utilizando sueros de centros de referencia autorizados.

Las amplias encuestas seroepidemiológicas necesitan una tecnología distinta de la que requieren los diagnósticos de casos clínicos, para los que se recomienda una serie de pruebas serológicas dirigidas a garantizar la máxima sensibilidad. Probablemente el mejor método para las encuestas en masa que exigen el ensayo de centenares de especímenes es la obtención de muestras de sangre digital en papel de filtro, pero este sistema debe estandarizarse para la inmunofluorescencia y otras técnicas serológicas. Se requieren más estudios sobre los detalles de orden práctico relativos a la logística de encuestas en masa en todas, o en la mayoría de las zonas endémicas, la persistencia de anticuerpos en papel de filtro en diferentes condiciones (temperatura y humedad), técnicas serológicas utilizadas y evaluación de los resultados.

En la enfermedad de Chagas crónica se presenta parasitemia a un nivel muy bajo, lo que refleja el constante equilibrio entre huésped y parásito. En este caso, el examen de sangre fresca o los métodos afines no detectan tripomastigotes; asimismo, el hemocultivo y la inoculación en animales ofrece resultados muy deficientes. El xenodiagnóstico se sigue utilizando de manera considerable. Este es un método más bien primitivo que consiste en permitir a insectos no contaminados—reproducidos en el laboratorio—alimentarse de pacientes y al cabo de un mes o dos, se procede a la disección de estos insectos en busca de flagelados en su intestino.

Salvo que se empleen grandes cantidades de insectos y se practiquen las pruebas repetidas veces, las tasas de positividad resultan bajas. Xenodiagnósticos seriados efectuados durante más de tres años de observación en 508 enfermos crónicos, utilizando 80 insectos cada mes, dieron una positividad general de 70.5% (10). Se ha recomendado practicar estudios de susceptibilidad de las distintas especies vectoras así como investigaciones sobre las diferencias intraespecíficas de la misma en las poblaciones reproducidas en el laboratorio. Hay ciertas indicaciones de que los factores genéticos pueden afectar la susceptibilidad de los insectos a la infección del *T. cruzi* y se ha observado que la progenie de insectos que no adquirieron la infección experimental resultó significativamente menos susceptible que la población general. En consecuencia, podrían seleccionarse poblaciones más apropiadas para ser usadas en el xenodiagnóstico. Además, deberían fomentarse otros estudios básicos sobre el ciclo biológico del *T. cruzi* en el vector y los factores que pueden afectar su desarrollo como temperatura, presencia de endosimbiontes, tasa de digestión de sangre y relaciones huésped-parásito entre insectos y parásitos de diferentes orígenes geográficos.

Minter-Goedbloed (11) examinó las supuestas potencialidades de los métodos de hemocultivo. En este aspecto es preciso establecer medios apropiados y analizar los factores que pueden impedir la proliferación de formas sanguíneas tales como la presencia de anticuerpos u otros factores inhibidores y la especial habilidad de evolución de los parásitos. También se ha sugerido el empleo de otros métodos, como la infección de estirpes celulares muy susceptibles en cultivo tisular con la sangre de pacientes humanos.

Patogenia de las infecciones por *T. cruzi*

La mayoría de los casos de enfermedad de Chagas crónica son asintomáticos. Un número variable de enfermos (alrededor de 20 a 30%) presentan indicaciones clínicas o electrocardiográficas de cardiopatía chagásica

que afectan principalmente a personas menores de 40 años. Estos enfermos muestran una gran variedad de alteraciones, desde cambios electrocardiográficos de menor importancia, hasta insuficiencia cardíaca y muerte repentina. En ciertas zonas endémicas, se han relacionado con la enfermedad de Chagas ciertas perturbaciones de la motilidad del esófago y el colon distal así como algunas dilataciones patológicas de estos órganos (megaesófago y megacolon). En Brasil central, de una serie de 966 pacientes con megasíndromes, el 90% obtuvo resultados serológicos positivos respecto a la enfermedad de Chagas y la mitad de ellos mostraron indicaciones de cardiopatía chagásica (12).

La patogenia de los trastornos clínicos de la enfermedad de Chagas es todavía muy discutida; sobre la base de información clínica y experimental, se ha determinado claramente que el *T. cruzi* produce una pronunciada disminución de las células ganglionares del sistema nervioso central, pero principalmente, en las del sistema automático del corazón y del plexo mientérico. Al parecer, el mecanismo que interviene en la destrucción de neuronas se activa por las sustancias liberadas por células huésped degeneradas o parásitos intracelulares que suscitan un proceso inflamatorio y producen lesiones regresivas de los ganglios y fibras nerviosas (13). Las perturbaciones en la peristalsis del esófago y colon afectados explican la actividad hipersecretoria de las neuronas sanas restantes que, aparentemente, aumentan su síntesis y liberan aminas biógenas activas (13).

No obstante, Teixeira sugirió que un mecanismo de hipersensibilidad retrasada podría producir lesiones cardíacas (14). En experimentos de cultivo tisular se observó una interacción citotóxica de los linfocitos de conejo sensibilizados con *T. cruzi*, con células cardíacas alogénicas parasitadas y no parasitadas. Otros estudios revelaron que fracciones subcelulares de células cardíacas y homogenados del *T. cruzi* contienen un

antígeno de reacción cruzada. Este antígeno induce una intensa reacción inmunitaria de base celular y es el causante de la interacción citotóxica. De esta manera, el mecanismo autoinmunitario mencionado explicaría la lesión tisular que ocurre durante la fase crónica de la enfermedad.

Andrade (15) ha estudiado la patología del bloqueo de rama derecho asociado con el hemibloqueo anterior izquierdo, el que figura —en una proporción de 30 a 60% de los informes publicados— como el trastorno electrocardiográfico más comúnmente hallado en la cardiomiopatía chagásica. Con el examen de 2,000 a 6,000 secciones seriadas (montadas en cintas de plástico transparente) de varios corazones estudiados, Andrade confirmó la selectividad de las lesiones en la mitad derecha del fascículo de His, “una curiosidad enigmática” en espera de una explicación plausible. Otra situación inexplicada e intrigante, también examinada por Andrade, fue la manifestación relativamente frecuente de dilataciones aneurismáticas del ápex ventricular izquierdo y fenómenos tromboembólicos observados en presencia o ausencia de insuficiencia cardíaca congestiva.

En algunas zonas de Brasil (16) se efectúan actualmente estudios longitudinales y transversales sobre “la evolución natural” de la cardiomiopatía chagásica en las regiones endémicas. Un estudio longitudinal en São Felipe, Bahía, demostró que durante los cinco años en que se realizó, alrededor del 5% de los casos de cardiomiopatía presentaron evolución de sus trastornos cardíacos en cada año del estudio. Asimismo, se observó que en todos los casos de muerte repentina, habían ocurrido alteraciones electrocardiográficas (la mitad de ellas con bloqueo AV completo). La mortalidad en la población infectada por *T. cruzi* fue de 10.3 por 1,000; alrededor del 57% de las defunciones fueron causadas directamente por la enfermedad de Chagas, y en el 37.5% de estas, la muerte fue repentina.

Las encuestas efectuadas en Venezuela y

Centro América revelaron una ausencia de megasíndromes, o bien, solo se observaron raramente, en cambio en Brasil central son muy frecuentes. No se ha hallado una explicación a dichas diferencias geográficas. Rezende (12) dio cuenta de 1,679 enfermos con megasíndromes a los que había examinado personalmente en esa zona.

Dvorak (17) afirmó que algunos puntos clave relacionados con los efectos nocivos de la infección por *T. cruzi* y la patología de la enfermedad de Chagas, solo podrán resolverse satisfactoriamente cuando se disponga de un mejor conocimiento de algunos factores biológicos básicos como el tropismo celular del parásito, los efectos de la genética del huésped o el parásito y la fisiología de la enfermedad. El propio Dvorak estableció un sistema *in vitro* de cultivo tisular con el empleo de una cámara de cultivo perfusable para estudiar la interacción celular *T. cruzi*-vertebrado. Con este sistema se está estudiando la dinámica de la invasión celular y la diferenciación de fases intracelulares. Asimismo, se está investigando la probable retrorregulación, genéticamente controlada, de la reproducción intracelular en varias células del huésped y la influencia de los parámetros físicos en la penetración de las células.

El *T. cruzi* y la respuesta inmunitaria del huésped

La enfermedad de Chagas crónica se caracteriza por un equilibrio entre el huésped y el parásito. Durante la fase crónica, en condiciones normales no ocurre curación espontánea ni una nueva fase aguda ya sea en la enfermedad experimental o en la humana. El huésped infectado suele desarrollar una fuerte inmunidad, de suerte que la reinfección no inducirá nuevos brotes de parasitemia intensa. No se ha determinado claramente el carácter de la respuesta inmunitaria; ahora bien, la inmunidad de base celular ha sido detectada, *in vitro*, por la inhibición de la migración de macrófagos y la transfor-

mación blástica de linfocitos. La intensificación de la infección por timentomía neonatal, la administración de sueros antitímocíticos específicos, así como la transferencia mediante linfocitos sensibilizados han aportado indicaciones *in vitro* de la participación de la inmunidad celular en la resistencia del huésped. Hoff (18) observó que los macrófagos activados eran resistentes a las infecciones por formas cultivadas del *T. cruzi*. Sin embargo, en el Simposio se recomendó llevar a cabo más investigaciones básicas para determinar la función de la inmunidad celular, obtener datos sobre la activación específica y no específica de macrófagos, sobre la transferencia de la inmunidad adoptiva de linfocitos T y B y la acción selectiva de la inmunidad celular contra las fases tisular y sanguínea del parásito.

La respuesta humoral en la enfermedad de Chagas se demuestra por el aumento precoz de los niveles de IgM y la producción de anticuerpos aglutinantes y precipitantes. En la fase crónica, las pruebas de fijación del complemento, la inmunofluorescencia y hemaglutinación suelen ser positivas. No obstante, la acción protectora de los anticuerpos séricos sigue siendo discutible a pesar de unos cuantos informes en los que resultó satisfactoria la transferencia pasiva de inmunidad. La incubación *in vitro* de formas sanguíneas con sueros inmunes aglutina los parásitos y disminuye la infecciosidad de los parásitos tratados que se han inoculado en huéspedes normales (19).

Debería investigarse la posibilidad de que inmunoglobulinas específicas sensibilicen a los parásitos y que estos, a su vez, sean luego destruidos por macrófagos o por lisis dependiente del complemento. Hasta la fecha, definir la función específica desempeñada por la inmunidad humoral y celular ha sido difícil: las ratas timentomizadas sometidas a la infección presentan una elevada parasitemia exacerbada a pesar de la producción de cantidades normales de anticuerpos, lo que sugiere que la resistencia se debe a la inmunidad celular; por otro lado, el suero

antitímocítico no parece afectar a la inmunidad en la fase crónica, lo que indica que la inmunidad humoral juega un papel fundamental.

Si bien los mecanismos de inmunidad no se conocen aún totalmente, no cabe duda que el parásito está en condiciones de evadir la respuesta inmunitaria del huésped y producir infecciones para toda la vida. Asimismo, hasta ahora no han sido demostradas con certeza en las infecciones por *T. cruzi* las variaciones antigénicas de las infecciones por tripanosomas africanos y *Plasmodium*. Con respecto al *T. cruzi*, no se han investigado aún los antígenos variantes que, en el caso del *T. brucei*, son glicoproteínas que se encuentran en la capa superficial del tripomastigote del torrente circulatorio. En forma similar debería investigarse la posibilidad de que los parásitos fijen a su superficie antígenos del huésped, evitando así la adhesión de anticuerpos específicos mediante un fenómeno semejante al de la infección por esquistosomas.

González-Cappa (20) ha estudiado las perspectivas de la vacunación contra la enfermedad de Chagas. Las tentativas de inducir inmunidad adquirida mediante la vacunación con parásitos muertos por agentes físicos o químicos solo producen, generalmente, resistencia parcial o insignificante. Las vacunas vivas o atenuadas representan un posible riesgo de inducir infecciones submanifiestas o crípticas que pueden resultar nocivas en enfermedades de larga evolución tales como la tripanosomiasis americana.

La quimioterapia de las infecciones por *T. cruzi*

Todavía se están investigando con carácter empírico los compuestos apropiados contra el *T. cruzi* (21). No obstante, se han descrito varios medicamentos que muestran una acción supresiva, algunos de los cuales han llegado a la etapa de ensayos clínicos. Ahora bien, los resultados son bastante desalentadores y en la actualidad no se dispone de

medicamento alguno que cure totalmente la enfermedad de Chagas y sea inocuo para el tratamiento clínico y colectivo.

En la quimioterapia experimental se ha demostrado que ciertas drogas supresivas, especialmente nitrofuranos, han erradicado la infección por *T. cruzi* cuando se administran a animales a largo plazo. Estos resultados experimentales brindaron un fuerte estímulo a los ensayos clínicos en muchas zonas endémicas de América Latina donde se habían tratado enfermos durante períodos prolongados (dos o tres meses). Con todo, los datos clínicos no constituyen criterios fidedignos para la evaluación de medicamentos ya que existe daño orgánico irreversible, principalmente en enfermos en la fase crónica, lo que probablemente no será afectado por el tratamiento. En consecuencia, se han establecido criterios parasitológicos para la evaluación de los medicamentos en la fase crónica que han sido descritos por Cançado *et al.* (22). De acuerdo con dichos criterios, se debe dividir a los enfermos en dos subgrupos comparables, uno que reciba un placebo y otro la medicación por el método de "double blind". Puesto que la parasitemia es muy baja en la fase crónica y es posible que en ciertos pacientes el xenodiagnóstico aparezca repetidamente negativo (Cançado estudió un caso chagásico que mostró 29 resultados negativos consecutivos), solo deben seleccionarse aquellos casos que antes del tratamiento muestren una tendencia a repetidos resultados positivos del xenodiagnóstico. En el período previo al tratamiento deben practicarse, por lo menos, tres pruebas serológicas: fijación del complemento, inmunofluorescencia y hemaglutinación. Una vez administrado el medicamento, debe procederse al xenodiagnóstico con 40 a 48 insectos y a las pruebas serológicas en ambos grupos, dos veces al mes y durante un año, por lo menos.

Con el empleo de métodos muy similares, algunos investigadores de Argentina y Brasil utilizaron un compuesto de nitrofurfurilideno en series de enfermos crónicos y llegaron a las conclusiones siguientes: en ambos países, los

enfermos mostraron repetidamente pruebas serológicas positivas después del tratamiento; la tasa de xenodiagnóstico negativo después de un período de 15 a 36 meses de control fue de 96.5% en Argentina (10), mientras que en Brasil fue solo de 30.8% transcurrido un período de control de cuatro años (22). La persistencia de pruebas serológicas positivas en todos los enfermos tratados y la discrepancia de resultados en las curaciones parasitológicas sigue sin explicación, lo que indica la dificultad de evaluar los ensayos clínicos en la enfermedad de Chagas.

Algunos datos experimentales indican que cepas distintas pueden exhibir diferencias de susceptibilidad al nitrofurano y a los derivados de nitroimidazol, hecho que puede repercutir en el tratamiento humano (23).

Gutteridge (21) procedió a un examen crítico de los conocimientos actuales acerca de la quimioterapia experimental de la enfermedad de Chagas y confirmó que los resultados son desalentadores. El propio autor sugirió las siguientes directrices para la investigación: estudios sobre la bioquímica de las fases intracelulares del parásito a fin de poder seleccionar los objetivos de ataque y ensayar compuestos con un fundamento más racional; sistemas apropiados de examen selectivo directo contra las fases intracelulares en sistemas acelulares, y aumento de los datos sobre el modo de acción de las drogas activas.

En vista de la creciente importancia de la transmisión por transfusión de sangre, se deberá dar mayor importancia al establecimiento de una prueba selectiva que permita añadir sin riesgo a la sangre almacenada en bancos, aquellos compuestos solubles, incoloros, estables y no tóxicos, que sean a la vez activos contra las formas sanguíneas del *T. cruzi*.

Metabolismo del *T. cruzi*

Los datos sobre la bioquímica del *T. cruzi* generalmente son aplicables a las formas de cultivo obtenidas en medios acelulares: las formas sanguíneas todavía no pueden sepa-

rarse fácilmente de las células sanguíneas, ni siquiera con columnas de intercambio de aniones y otros métodos, y solo hasta hace poco se han obtenido formas tisulares puras de huéspedes vertebrados infectados (24).

El *T. cruzi* no almacena polisacáridos, la utilización de lípidos y proteínas sostiene su respiración endógena. Una gran proporción de glucosa se metaboliza a través de la glicosis utilizando un ciclo de ácido tricarbóxico. También se han detectado dos enzimas esenciales de la cadena pentosa-fosfato; se ha descrito una cadena respiratoria que contiene citocromo C y se ha mostrado que en formas cultivadas, sanguíneas y tisulares aparece una baja actividad de citocromo oxidasa. Sin embargo, no se ha detectado un sistema de L- α -glicerofosfato oxidasa o su equivalente. Estos resultados mantienen un interés general puesto que, al parecer, en los tripanosomas africanos salivarios y en diferentes fases de desarrollo del parásito, ocurre una alteración de un metabolismo basado en la cadena citocrómica a otra vía metabólica no citocrómica y en ciertas formas, un sistema de L- α -glicerofosfato oxidasa insensible al cianuro sustituye al sistema citocrómico. En consecuencia, quedan por demostrarse en el ciclo del *T. cruzi* dichas diferencias en el metabolismo energético de las distintas fases mencionadas. Se ha descrito también la presencia de organelas semejantes a peroxisomas extramitocondriales que suelen contener L- α -glicerofosfato oxidasa, en las formas sanguíneas del *T. cruzi*, pero no ha sido detectada su actividad enzimática.

Poco se sabe de la síntesis o catabolismo de las proteínas. Se ha informado de la absorción por transporte activo de unos cuantos aminoácidos en medios de cultivo, pero no se tiene conocimiento alguno acerca de su utilización en la síntesis proteínica ni sobre el funcionamiento de ribosomas. Tampoco se han investigado las cadenas utilizadas para el empleo de proteínas como fuente de energía, solo se ha descrito la actividad de transaminasa.

Aun cuando los lípidos representan aproximadamente el 20% del peso seco del *T. cruzi*, es muy poco lo que se sabe acerca de su función y metabolismo. La composición de los medios de cultivo influye en la composición de lípidos del parásito; es decir, en flagelados cultivados en medios exentos de colesterol no se observa esta sustancia, pero están presentes los ergosteroles. Por consiguiente, el colesterol parece ser de origen exógeno y no se metaboliza más. Por lo que toca a la síntesis de ácidos grasos y las cadenas de catabolismo de grasa para la producción de energía, no se dispone de información.

El *T. cruzi* está adquiriendo gran popularidad entre los biólogos moleculares interesados en la estructura y función de ADN extranuclear o mitocondrial. Como ocurre con otros flagelados, alrededor del 20% de su ADN total se encuentra en el cinetoplasto, una organela todavía no bien definida. Puesto que es uno de los pocos *Trypanosomatidae* patógenos cultivados en medios acelulares, el *T. cruzi* se ha utilizado como instrumento para investigar la composición base de ADN de cinetoplasto, la estructura molecular, la capacidad de codificar proteínas de polipéptidos y la función de la biogénesis de las mitocondrias.

La ultracentrifugación en gradientes de densidad de C_1 y C_s isopícnico de formas cultivadas demostró la presencia de una banda "mayor" y otra satélite, con diferente composición de bases, que corresponden al ADN nuclear y de cinetoplasto. En estudios recientes sobre los dos componentes de ADN de formas cultivadas, sanguíneas e intracelulares se reveló que hay más ADN cinetoplástico en las formas sanguíneas que en las otras dos. Los gradientes de densidades de ambos componentes de ADN han sido estudiados con gran detenimiento; sin embargo, la ARN polimerasa ADN-dependiente no ha sido aislada ni caracterizada y nada se sabe sobre las formas de transcripción y traducción de la información genética contenida en ADN cinetoplástico.

En estudios del metabolismo de los ácidos nucleicos en formas cultivadas del *T. cruzi* se ha indicado que aparentemente estas fases no pueden sintetizar "de novo" purinas y pirimidinas sino que dependen de purinas y pirimidinas exógenas previamente formadas. Los estudios con las fases intracelulares de cultivos tisulares y amastigotes aislados indican que la síntesis de las purinas y pirimidinas en realidad se hace "de novo". Puesto que la dependencia de formas flageladas en purinas previamente formadas es rara entre los *Trypanosomatidae* cultivados en medios definidos (los cuales obtienen pirimidinas por síntesis "de novo"), este problema debería estudiarse experimentalmente.

Control de la enfermedad de Chagas

Para controlar la transmisión de la enfermedad de Chagas normalmente se emplean insecticidas de acción residual como el hexacloruro de benceno (BHC) y derivados organofosforados. El BHC es activo por un plazo de tres a seis meses y se ha empleado extensamente en las zonas endémicas de Brasil. Los insecticidas reducen la población vectora de manera considerable así como los riesgos de transmisión y son todavía el mejor método para combatir la enfermedad de Chagas. No obstante, pueden identificarse ciertos inconvenientes reales y preverse riesgos futuros a consecuencia de las campañas masivas y repetidas que exige el control eficaz. Salvo que se introduzcan cambios radicales en la vivienda rural, tendrá que procederse repetidamente al rociamiento con insecticida de acción residual y someter las zonas aparentemente exentas de vectores, a un largo período de vigilancia lo que producirá un aumento de los costes; además, es probable que las poblaciones animales y humanas acumulen hidrocarburos clorados de larga duración. Por último, en el futuro puede surgir una resistencia a los insecticidas como ya se ha observado en ciertas zonas. Especies vectoras casi erradicadas por los insecticidas pueden ser

sustituidas por otras en cuanto se interrumpen las campañas.

Como posible método profiláctico para la enfermedad de Chagas se ha sugerido el empleo de sustancias que actúan como hormona juvenil (25). Se ha observado que dosis muy bajas de esas hormonas o sustancias análogas impiden el desarrollo de insectos adultos fecundos. Dichas sustancias interfieren en la metamorfosis de los artrópodos y filós afines pero aparentemente no afectan a los mamíferos y, por lo tanto, no existe riesgo importante de contaminación del medio. Se han efectuado ensayos con la hormona incorporada a un polvo tanto en el laboratorio como sobre el terreno y se han obtenido resultados prometedores. De todas maneras, se requieren más datos para evaluar el porcentaje de insectos afectados por la hormona juvenil y su longevidad en las casas tratadas. Por otra parte, se ha procedido a evaluar el coste de esas operaciones; los resultados de dicha evaluación dependerán de la duración del compuesto en las condiciones de campo.

La profilaxis de la transmisión por transfusiones de sangre todavía tiene como base el rechazo de los donantes que presentan pruebas serológicas positivas respecto a la enfermedad de Chagas y la adición de violeta de genciana a la sangre de los bancos. Ya se ha discutido el mejoramiento de las pruebas serológicas y la selección de medicamentos que deberán añadirse a la sangre; se necesita ahora dar mayor impulso a la investigación de los métodos para mejorar la vivienda.

Resumen

En el estudio de las variaciones intra-específicas del *Trypanosoma cruzi* se discuten el método de la determinación de isoenzimas, de la densidad flotante del ADN y otros métodos para la identificación de cepas; se recomienda el fomento de métodos de criopreservación y "bancos de tripanosomas".

Existen contactos entre vectores, especies de animales salvajes infectadas y especies domiciliarias, así como intrusión del hombre

en focos naturales y migraciones demográficas internas de zonas rurales a urbanas. Se ha constatado un desplazamiento del *T. cruzi* del ciclo selvático al domiciliario y la transformación gradual de la tripanosomiasis americana de enfermedad rural a enfermedad urbana. Todo ello exige la utilización de métodos ecológicos nuevos para estudiar estas corrientes y tendencias.

En cuanto a diagnóstico se recomienda practicar estudios sobre composición de extractos antigénicos, caracterización antigénica de cepas diferentes y fases distintas de desarrollo, utilizando sueros de centros de referencia autorizados. Además, se presentan estudios sobre pruebas serológicas, exámenes de sangre fresca y xenodiagnóstico.

La transmisión de la enfermedad de Chagas en zonas endémicas se realiza ante la presencia de personas susceptibles, vectores domiciliarios activos y parásitos viables. Los insecticidas de acción residual continúan siendo los más eficaces contra esta forma de transmisión. En orden de importancia, la transfusión de sangre constituye el segundo modo de transmisión en zonas endémicas y no endémicas; la profilaxis recomendada es el rechazo de los donantes a los que se comprueba infección. En los últimos años se han notificado casos de la enfermedad congénita.

Los aspectos clínicos de la enfermedad de Chagas varían mucho de un paciente a otro y entre pacientes de distintas regiones. Solo el conocimiento del tropismo celular del parásito, de la genética del huésped o el parásito y de la fisiología de la enfermedad permitirá resolver problemas sobre los efectos de la infección y sobre la compleja patogenia de la enfermedad.

Se recomienda llevar a cabo más investigaciones básicas para determinar la función de la inmunidad celular, obtener datos sobre la activación de macrófagos específicos y no específicos, sobre la transferencia de la inmunidad adoptiva de linfocitos T y B y la acción selectiva de la inmunidad celular contra las fases tisular y sanguínea. Asimismo, se analizan las perspectivas de la vacunación contra la enfermedad de Chagas.

En la actualidad no se dispone de medicamento alguno que cure totalmente la afección y sea inocuo para el tratamiento clínico y colectivo. En consecuencia se sugirieron estudios sobre la bioquímica de las fases intracelulares del parásito, investigación de sistemas apropiados de examen selectivo directo contra las fases intracelulares en

sistemas acelulares, y acopio de datos sobre el modo de acción de las drogas activas.

En cuanto al control de la tripanosomiasis americana—aparte de los métodos ya señalados—se menciona la posibilidad de emplear sustancias que actúen como hormona juvenil e impidan la metamorfosis total del insecto vector. □

REFERENCIAS

Los artículos que se citan a continuación se presentaron al Simposio sobre Nuevos Enfoques en la Investigación de la Tripanosomiasis Americana y aparecen publicados en American Trypanosomiasis Research, Publicación Científica de la OPS 318, 1976.

- (1) Godfrey, D. G. Biochemical strain characterization of trypanosomes.
- (2) Barretto, M. P. Possible role of wild mammals and triatomines in the transmission of *Trypanosoma* to man.
- (3) Avila-Pires, F. D. Ecology of small mammals in relation to sylvan and domestic transmission cycles.
- (4) Miles, M. A. Distribution and importance of triatominae as vectors of *T. cruzi*.
- (5) Rodrigues da Silva, G. Chagas' disease as an urban problem.
- (6) Minter, D. M. Feeding patterns of some triatomine vector species.
- (7) Zeledón, R. Effects of triatomine behavior on trypanosome transmission.
- (8) Rabinovich, J. E. y O. Rossell. Mathematical models and ecology of Chagas' disease.
- (9) Camargo, M. E. Serologic diagnosis of Chagas' disease.
- (10) Cerisola, J. A. Xenodiagnosis.
- (11) Minter-Goedbloed, E. Hemoculture compared with xenodiagnosis for the detection of *T. cruzi* infection in man and in animals.
- (12) Rezende, J. M. Chagasic mega syndromes and regional differences.
- (13) Tafuri, W. L. Fine structure of Chagas' disease lesions.
- (14) Teixeira, A. R. L. Autoimmune mechanisms in Chagas' disease.
- (15) Andrade, Z. A. Chagas' disease: pathology of the cardiac lesions.
- (16) Prata, A. R. Natural history of chagasic cardiomyopathy.
- (17) Dvorak, J. A. New *in vitro* approach to quantitation of *Trypanosoma cruzi*-vertebrate cell interactions.
- (18) Hoff, R. Recent advances in cell-mediated immunity to *Trypanosoma cruzi*.
- (19) Krettli, A. V. y Z. Brener. Humoral immunity in Chagas' disease.
- (20) González-Cappa, S. M. Antigenic variation, antigenic typing, exoantigens, and prospects for vaccines.
- (21) Gutteridge, W. E. Biochemistry of *Trypanosoma cruzi*.
- (22) Cançado, J. R. *et al.* Clinical trials in Chagas' disease.
- (23) Brener, Z. Aspects of experimental chemotherapy.
- (24) Gutteridge, W. E. Experimental chemotherapy of Chagas' disease.
- (25) Gilbert, B. Possible use of juvenile hormone mimics in vector control.

Symposium on new approaches in research on American trypanosomiasis (Summary)

Methods of identifying strains, distinguishing isoenzymes, and of determining the buoyant density of DNA were discussed in connection with the study of *Trypanosoma cruzi* intraspecific variations; the promotion of cryopreservation and "trypanosome banks" was recommended.

Contacts occur between vectors, infected wild animal species, and domiciliary animals, and there is intrusion of man into natural foci and internal population movements from rural to urban areas as

well. *T. cruzi* seems to be shifting from a selvatic to the domiciliary cycle, and American trypanosomiasis is gradually changing from a rural to an urban disease. New ecologic methods are needed to study these trends.

It was recommended that for diagnostic purposes studies be made of the composition of antigenic extracts, antigenic characterization of different strains, and different phases of development, for which purpose sera from authorized

reference centers should be used. In addition, papers on serologic tests, fresh blood examinations, and xenodiagnosis were presented.

Chagas' disease is transmitted within endemic areas by susceptible humans, active domiciliary vectors, and viable parasites. Residual-action insecticides continue to be the most effective means of controlling this form of transmission. The second most important mode of transmission in both endemic and nonendemic areas is blood transfusion; the refusal of donors proven to be infected is recommended. In recent years, congenital cases of the disease have been reported.

The clinical aspects of Chagas' disease vary considerably from one patient to another and among patients in different regions. Problems of the effects of the infection and of the complicated pathogenesis of the disease can only be solved through knowledge of the cell tropism of the parasite, the genetics of the host or the parasite, and the physiology of the disease.

Further basic research was recommended to determine the role of cell-mediated immunity, to obtain data on specific and nonspecific macrophage activation, on adoptive immunity transference of T and B lymphocytes, and on selective action of cellular immunity against tissue and bloodstream stages. The prospects of a vaccine for Chagas' disease were also discussed.

At present no drug is available that completely cures the disease and is safe for clinical and mass treatment. Consequently, it was suggested that studies be made of the biochemistry of the intracellular stages of the parasite as well as of suitable direct-screening systems against intracellular stages in cell-free systems; it was further recommended that data on the mode of action of active drugs be collected.

In addition to the methods already mentioned for the control of American trypanosomiasis, the possibility of using substances that act as juvenile hormones and prevent the complete metamorphosis of the vector was mentioned.

Simpósio sobre novos critérios de pesquisa da tripanossomíase americana (Resumo)

No estudo das variações intra-específicas do *Trypanosoma cruzi* discutem-se o método de determinação de isoenzimas da densidade flutuante do ADN e os métodos de identificação de cepas; recomenda-se o fomento de outros métodos de criopreservação e de "bancos de tripanossomas".

Há contatos entre vetores, espécies de animais selvagens infectadas e espécies domésticas, bem como intrusão do homem em focos naturais e migrações demográficas internas de zonas rurais e urbanas. Constatou-se um deslocamento de *T. cruzi* do ciclo selvático para o doméstico, e a transformação gradual da tripanossomíase americana de doença rural em urbana. Tudo isso exige a utilização de métodos ecológicos novos para o estudo das correntes e tendências.

Quanto ao diagnóstico, recomenda-se a realização de estudos sobre composição de extratos antigênicos, caracterização antigênica de cepas diferentes e fases distintas de desenvolvimento, com a utilização de soros de centros de referência autorizados. Também são apresentados estudos sobre provas sorológicas, exames de sangue fresco e xenodiagnóstico.

A transmissão da doença de Chagas em zonas endêmicas ocorre com a presença de pessoas suscetíveis, vetores domésticos ativos e parasitos viáveis. Os inseticidas de ação residual seguem sendo os mais eficazes contra essa forma de transmissão. Por ordem de importância, a transfusão de

sangue constitui o segundo modo de transmissão em zonas endêmicas e não endêmicas; a profilaxia recomendada é a recusa dos doadores com infecção comprovada. Nos últimos anos, têm sido notificados casos de doença congênita.

Os aspectos clínicos da doença de Chagas variam muito de um para outro paciente e entre pacientes de diferentes regiões. Somente o conhecimento do tropismo celular do parasito, da genética do hospedeiro ou do parasito e da fisiologia da doença possibilitará a solução de problemas referentes aos efeitos da infecção e à complexa patogênese da doença.

Recomenda-se a realização de novas pesquisas básicas para determinar a função da imunidade de base celular, obter dados sobre a ativação de macrófagos específicos e não específicos, sobre a transferência da imunidade adotiva de linfócitos T e B e sobre a ação seletiva da imunidade celular contra as fases tissular e sanguínea. Analisam-se também as perspectivas da vacinação contra a doença de Chagas.

Atualmente, não há nenhum medicamento que cure totalmente a afecção e seja inócuo para o tratamento químico e coletivo. Portanto, sugerem-se estudos sobre a bioquímica das fases intracelulares do parasito, a pesquisa de sistemas adequados de exame seletivo directo contra as fases intracelulares em sistemas acelulares, e a coleta de dados sobre o modo de ação das drogas ativas.

Quanto ao controle da tripanossomíase americana é mencionada—além dos métodos assinalados—a possibilidade de preparar substâncias que

ajam como hormônio juvenilizante e impeçam a metamorfose total do inseto vetor.

Symposium sur de nouvelles méthodes d'étude de la trypanosomiase américaine (Résumé)

L'étude des variations intraspécifiques de *Trypanosoma cruzi* examine la méthode de détermination de isoenzymes, de la densité flottante de l'ADN ainsi que les techniques d'identification des souches. Elle recommande l'application des méthodes de cryopréservation et de "bancs de trypanosomes".

Il existe des contacts entre les vecteurs, les espèces des animaux sauvages infectées et les espèces domiciliaires, ainsi que l'intrusion de l'homme dans des foyers naturels et les migrations démographiques internes des zones rurales aux zones urbaines. On a constaté un déplacement de *T. cruzi* du cycle sauvage au cycle domiciliaire et la transformation progressive de la trypanosomiase américaine d'une maladie rurale en une maladie urbaine. Tout cela exige le recours à des méthodes écologiques nouvelles pour étudier ces courants et ces tendances.

Pour ce qui est du diagnostic, l'étude recommande de faire une analyse de la composition des extraits antigènes, de la spécification antigène des différentes souches et des phases de développement, en utilisant à cette fin sérums de centres de référence autorisés. De plus, elle présente divers examens d'épreuves sérologiques, des analyses de sang frais et un xénodiagnostic.

La transmission de la maladie de Chagas dans les zones endémiques a lieu en présence de personnes vulnérables, de vecteurs domiciliaires actifs et de parasites viables. Les insecticides d'action résiduelle continuent d'être les moyens de lutte les plus efficaces contre ce type de transmission. Par ordre d'importance, la transfusion de sang vient au deuxième rang des types de transmission dans les zones endémiques et non endémiques; la pro-

phylaxie recommandée est le rejet des donneurs infectés. Ces dernières années, des cas de maladie congénitale ont été notifiés.

L'aspect clinique de la maladie de Chagas varie beaucoup d'un patient à l'autre ainsi qu'entre les patients de diverses régions. Seule la connaissance du tropisme cellulaire du parasite, de la génétique de l'hôte ou du parasite et de la physiologie de la maladie permettra de résoudre les problèmes des effets de l'infection et de la pathogénie complexe de la maladie.

L'étude recommande de réaliser des enquêtes de base pour déterminer la fonction de l'immunité cellulaire de base, obtenir des données sur l'activation de macrophages spécifiques et non spécifiques, sur le transfert de l'immunité adoptive des lymphocytes T et B et sur l'action sélective de l'immunité cellulaire contre les phases tissulaire et sanguine. Par ailleurs, elle analyse les perspectives de la vaccination contre la maladie de Chagas.

On ne dispose pas à l'heure actuelle de médicament qui puisse guérir complètement l'affection et qui soit inoffensif pour le traitement clinique et collectif. En conséquence, il est suggéré d'étudier la biochimie des phases intracellulaires du parasite, d'examiner les systèmes appropriés d'analyse sélective directe contre les phases intracellulaires dans des systèmes acellulaires et de rassembler des données sur le mode d'action des médicaments efficaces.

En ce qui concerne la lutte contre la trypanosomiase américaine, l'étude mentionne outre les méthodes déjà indiquées, la possibilité d'employer des substances qui servent d'hormone juvénile et empêchent la métamorphose totale de l'insecte vecteur.