

MORFOGÉNESIS DE *TRYPANOSOMA CRUZI*: FACTORES RELEVANTES PARA LA DIFERENCIACIÓN *IN VITRO*

TRYPANOSOMA CRUZI MORPHOGENESIS: RELEVANT FACTORS FOR *IN VITRO* DIFFERENTIATION

Victor T. Contreras A., Ana R. De Lima R., María C. Navarro A.

RESUMEN

En este artículo nosotros revisamos el estado actual de la morfogénesis de *Trypanosoma cruzi* *in vivo* e *in vitro* examinando los siguientes aspectos a) la definición de estadio del parásito y el concepto de competencia, b) epimastigogénesis y metacicloogénesis en el vector e inducida *in vitro*, c) amastigogénesis y tripomas-tigogénesis extra e intracelular. Nosotros enfatizamos el papel que juegan algunos factores que disparan los procesos de diferenciación en condiciones axénicas. Proponemos como hipótesis que en los hospedadores vertebrado e invertebrado, la secuencia de eventos morfológicos son equivalentes y solo difiere la velocidad en que ocurren en función de la temperatura microambiental.

ABSTRACT

In this article we review the current status of the morphogenesis of *Trypanosoma cruzi* *in vivo* and *in vitro* examining the following aspects a) definition of developmental stages of the parasite and competence concept, b) epimastigogenesis and metacyclogenesis in the vector and induced *in vitro*, c) amastigogenesis and trypomastigogenesis extra and intracellular. We emphasize the role of some factors that in axenic conditions trigger the differentiation processes. We hypothesize that the sequence of morphological events in the invertebrate and vertebrate host are equivalent and that they differ only in the speed in which the differentiation processes occur in function of the environmental temperature.

Palabras clave: *T. cruzi*, morfogénesis, diferenciación *in vitro*, Enfermedad de Chagas

Keywords: *T. cruzi*, morphogenesis, *in vitro* differentiation, Chagas Disease.

INTRODUCCIÓN

La Enfermedad de Chagas es problema de Salud Pública en Centro y Sudamérica. Se estima entre 16 y 18 millones la población infectada y en 100 millones la población expuesta a riesgo de contraer la enfermedad OPS/OMS, 2004). La enfermedad es causada por *Trypanosoma cruzi*, un protozoario de la Familia *Trypanosomatidae* el cual cierra su ciclo en la naturaleza en dos hospedadores diferentes: uno invertebrado, representado por insectos reduvídeos de la sub-Familia *Triatominae* y otro vertebrado representado por mamíferos como el hombre, animales domésticos y silvestres. Aún cuando se ha reportado la evolución intracelómica de *T. cruzi* en el triatomo

(Lacombe, 1980), las morfologías observadas en los hemocitos y células de los túbulos de Malpigi de los insectos parecen ser parte de fases del ciclo esporogónico y esquizogónico de microsporidios que infectan a esos triatomos (Zeledón, 1999). *T. cruzi* puede cerrar su ciclo completo en el hospedador vertebrado, particularmente en didelfidios (Deane y col., 1984; Urdaneta-Morales y Nironi, 1996). Se ha propuesto que la presencia de epimastigotas y metacíclicos en las glándulas anales del *Opussum* responden a un mecanismo de escape del parásito en el hospedador vertebrado (Lenzi y col., 1984). Con las excepciones referidas, se acepta que el ciclo de *T. cruzi* ocurre entre invertebrados y vertebrados, presentando cuatro estadios dominantes, identificados como epimastigotas, tripomastigotas metacíclicos, amastigotas y tripomastigotas sanguí-

neos. En cada hospedador, el parásito se multiplica y transforma mediante varias morfologías o estadios cuyas propiedades biológicas son distintas y se localizan en microambientes diferentes. El ciclo se inicia con los tripomastigotas metacíclicos excretados por el insecto, los cuales invaden la células del vertebrado y se transforman en amastigotas; éstos se multiplican y transforman en tripomastigotas sanguíneos que luego abandonan la célula para invadir nuevas células y mantener la infección del vertebrado, repitiendo el ciclo amastigotas-tripomastigotas. Alternativamente, cuando los tripomastigotas sanguíneos son ingeridos por el vector se transforman en epimastigotas y posteriormente en tripomastigotas metacíclicos. Esta secuencia de eventos y estadios aún se mantiene desde la primera descripción del ciclo completo hecha por Días (1934). La fácil identificación morfológica de los estadios de *T. cruzi*, permiten emplearlo como modelo en estudios de morfogénesis para identificar factores microambientales que disparan diferenciación. La simulación de los procesos de diferenciación que ocurren durante el ciclo vital de *T. cruzi* *in vitro* y particularmente en condiciones axénicas, evita las complicaciones de mantenimiento de hospedadores intermediarios y definitivos en el laboratorio. Además, permite producir cantidades masivas de cada uno de los estadios útiles para estudios bioquímicos, fisiológicos y antigénicos. En este artículo se presenta una visión de los factores relevantes para la diferenciación *in vitro* del parásito, basada en investigaciones propias en condiciones axénicas y una breve revisión de la literatura específica del tema.

Los estadios del ciclo vital y el concepto de competencia.

Para analizar la morfogénesis de *T. cruzi* en condiciones axénicas, se necesita fijar posición sobre cuántos son los verdaderos estadios del ciclo tomando criterios mas allá que la forma general del parásito, posición del kinetoplasto en relación al núcleo y la región de emergencia del flagelo. Se aceptan tres morfologías que son epimastigotas, tripomastigotas y amastigotas y cuatro estadios (Brenner, 1973), considerando que los tripomastigotas metacíclicos y sanguíneos corresponden a dos estadios diferentes en base a sus propiedades biológicas, características metabólicas y expresión génica

y antigénica. Si bien existen excelentes revisiones que refieren las denominaciones dadas a las morfologías y contribuyen a dilucidar aspectos del ciclo vital de *T. cruzi* (De Souza, 1984; 1999; 2002); sin embargo, todavía existen aspectos que se mantienen controversiales o desconocidos (Tyler y Engman, 2001). Se han descrito formas de transición entre estadios tanto en los hospedadores vertebrado e invertebrado como en los medios de cultivo los cuales parecen ser verdaderos estadios en base a su expresión génica, propiedades biológicas y diferencias morfológicas, metabólicas y antigénicas (Faucher y col., 1995; Almeida de Faria y col., 1999; Kollien y Schaub, 2000; Tonelli y col., 2004; Bourguignon y col., 2006).

Antes de estudiar a nivel molecular un estadio obtenido *in vitro*, nuestro equipo toma en consideración el cumplimiento por parte de ese estadio de los parámetros parasitológicos establecidos en el ciclo natural del parásito. Cumpliendo con esa premisa, aceptamos la existencia de cuatro estadios fundamentales en el ciclo axénico de *T. cruzi*, los cuales están definidos por criterios tales como una morfología típica, su localización, la procedencia del estadio y las propiedades biológicas. En consecuencia, el estadio epimastigota corresponde a una morfología equivalente a la presente en el intestino medio del insecto, producido en medios de cultivo axénicos a temperatura ambiente, procedente de tripomastigotas sanguíneos, con capacidad replicativa, no invade activamente células, no resiste la digestión macrofágica ni la acción del complemento. En este sentido los epimastigotas presentes en el sobrenadante de cultivos de células a 37°C, derivados de amastigotas o presentes en el interior celular, pueden representar formas de transición entre estadios ó formas accidentales útiles para la sobre-vivencia del parásito en microambientes ajenos a su condición natural. Se establece como estadio metacíclico aquella (morfología tripomastigota equivalente a la presente en la porción final del intestino recto del vector), que aparece en la fase estacionaria de cultivos envejecidos o su equivalente a temperatura ambiente, procedente de epimastigotas, sin capacidad multiplicativa, invade activa o pasivamente y coloniza células, resiste la digestión macrofágica y la acción del complemento. En consecuencia, formas tripomastigotas finas derivadas de cultivos celulares *in vitro* a 37°C y de inicio de

infección del vertebrado, no se corresponden con el estadio metacíclico. Se admite como estadio amastigota aquella morfología equivalente a la presente en el interior celular que aparece en cultivos celulares o acelulares a 37 °C de temperatura, procede de tripomastigotas metacíclicos o tripomastigotas sanguíneos, resiste la acción del complemento, no invade activamente las células pero si es fagocitado por cualquier célula, evade la digestión macrofágica y tiene capacidad multiplicativa intracelular. En consecuencia, formas circulares o redondeadas vacuoladas derivadas de epimastigotes envejecidos o inducidas por agentes químicos sin capacidad multiplicativa, no son amastigotas verdaderos y generalmente aparecen como formas degenerativas en respuesta a microambientes adversos. Se considera estadio tripomastigota hemático aquella morfología tripomastigota equivalente a la presente en la sangre del vertebrado que aparece en sobrenadantes de cultivos celulares *in vitro* a 37 °C, procede de amastigotas, sin capacidad multiplicativa, invade activamente la célula y la coloniza, resiste la acción del complemento y evade la digestión macrofágica y puede continuar el ciclo en el hospedador invertebrado.

Nuestro grupo de trabajo aborda el estudio de la morfogénesis de *T. cruzi* inducida *in vitro* en condiciones axénicas ajustado a dos premisas fundamentales: a) la inducción de estadios se basa en el concepto de competencia definido por Deane y col. (1984) quienes propusieron que multiplicación y diferenciación son procesos excluyentes donde la transformación morfológica garantiza la entrada y transporte del parásito en su hospedador alternativo, para lo cual, parte de la población se compromete haciéndose competente para el nuevo hábitat; y b) que los estadios obtenidos cumplan con los parámetros parasitológicos previamente definidos antes de ser estudiados a nivel peptídico, glicopéptido y antigénico.

Epimastigogénesis en el vector e inducida *in vitro*

Los eventos de transformación de *T. cruzi* que ocurren en el invertebrado a temperatura ambiente se inician en la porción anterior del intestino del insecto con la ingestión de formas tripomastigotas sanguíneas. Por extensión de la nomenclatura usa-

da para otros procesos de diferenciación, algunos autores denominan este proceso como epimastigogénesis (Rondinelli y col., 1988). En revisiones recientes del ciclo vital del parásito en el invertebrado (De Souza, 1999; 2002) se asume que en el estómago (intestino medio anterior) del triatomino, la mayoría de los tripomastigotas sanguíneos se transforman en epimastigotas y algunas formas redondeadas (Zeledón y col., 1997). Brack (1968), propuso la presencia de una morfología temprana describiéndola como una forma redondeada con flagelo esferomastigota) “forma de espátula o forma de gota”, la cual se transforma en epimastigota corto multi-plicante, el cual se diferencia a esferomastigota ó a epimastigota largo, este último con pérdida de la capacidad replicativa. Formas redondeadas fueron también reportadas por Brener (1972) y confirmadas por Petana (1972), describiendo la existencia de agregados de amastigotas intercomunicados, presentes en el intestino anterior del insecto y sugiriendo probable intercambio genético.

Kollien y Schaub (2000), consideraron que al momento de la ingesta sanguínea, los parásitos son expuestos a la saliva, enzimas digestivas y fuertes cambios en factores como temperatura, osmolaridad y suplemento de nutrientes. Adicionalmente hay factores hemolíticos en el estómago de *R. prolixus* que pueden afectar a *T. cruzi* (Azambuja y col., 1983, 1989). Así, un clon resistente a lisis como el Dm28c, mantiene mayores niveles de infección que un aislado más sensible como la cepa Y (Mello y col., 1996). Además, en el estómago de *R. prolixus* se demostró la existencia de una aglutinina, la cual ejerce su efecto sobre el clon Dm28c y no sobre la cepa Y (Ratcliffe y col., 1996). En el establecimiento de la infección del insecto con *T. cruzi*, se han implicado otros factores como el papel de fragmentos de hemoglobina bioactivos (García y col., 1995), ayuno prolongado del insecto (Kollien y Schaub, 1998b) y más recientemente, la liberación de hormonas por parte del sistema endocrino del triatomino (Azambuja y col., 2004). Algunos autores como García y Azambuja (1991), proponen que los tripomastigotas sanguíneos se pueden diferenciar directamente en epimastigotas, esferomastigotas y amastigotas, y que todos ellos se transforman en epimastigotas. Kollien y Schaub (1998a, 1998b), mostraron evidencias indicando que los esferomastigotas representan una condición

de adaptación del flagelado a las condiciones de estrés y que en condiciones de riqueza nutricional por ingesta sanguínea reciente en insectos sometidos a acentuado ayuno se incrementa significativamente una rara morfología identificada como células gigantes, generadas por división múltiple y acelerada de esferomastigotas y formas en gota, las cuales producen formas epimastigotas antes de diferenciarse en metacíclicos. Posteriormente plantean que de la población total de tripomastigotas ingeridos por el vector, algunos se transforman directamente en epimastigotas y otros pasan por un proceso adicional donde adquieren formas redondeadas con flagelo libre esferomastigotas). Estos esferomastigotas pueden transformarse en epimastigotas cortos, con capacidad replicativa que permanecen en el estómago ó en epimastigotas largos que aparentemente no se dividen y se dirigen a la porción final del tracto intestinal, pudiendo observarse a lo largo del tracto intestinal del insecto hasta dieciocho morfologías diferentes (Kollien y Schaub, 2000).

Tyler y Engman (2001) revisaron el ciclo vital de *T. cruzi* y en relación a los eventos morfológicos que ocurren durante la epimastigogénesis plantearon que el insecto ingiere una población pleomórfica constituida de tripomastigotas finos, gruesos e inclusive amastigotas, que los tripomastigotas se transforman en amastigotas y que es a partir de éstos que ocurre la diferenciación hacia epimastigotas. Los amastigotas se agrandan y extienden su flagelo esferomastigotas), el cuerpo celular y flagelo se alargan cuando la densidad celular incrementa, alcanzando la forma típica del epimastigota. *In vitro*, la transformación del amastigota en epimastigota alargado, parece ser reversible y dependiente de la concentración de glucosa (Tyler y Engman, 2000). Ellos destacan que en medios axénicos, las formas esferomastigotas descritas por otros autores aparecen tanto al inicio de la fase log como en la fase estacionaria tardía y que éstas, no se corresponden con los esferomastigotas observados por Kollien y Schaub (1998a), ya que en medio axénico las formas redondeadas al inicio son en realidad formas epimastigotas redondeadas con flagelo corto, producto de la presencia de glucosa en el medio y que la reducción de glucosa conduce a verdaderos epimastigotas, los cuales en la fase estacionaria se transforman en metacíclicos.

Es evidente que no hay acuerdo en la secuencia de eventos morfológicos que ocurren durante la epimastigogénesis y que sin duda, la constitución genética del aislado y los factores dependientes del triatomino juegan un papel importante para comprender la complejidad de los eventos que ocurren durante este proceso de diferenciación.

La simulación de los eventos que ocurren a lo largo del ciclo vital de *T. cruzi* en condiciones axénicas, son de utilidad para conocer el papel de factores tanto dependientes del parásito como microambientales. Se acepta que la caída de la temperatura dispara la epimastigogénesis por las evidencias que se observan en los hemocultivos. Si bien es indudable la importancia de la temperatura, vale la pena resaltar que en cultivos de células a 37°C es común observar cómo las formas tripomastigotas y amastigotas se transforman en epimastigotas (De Souza, 1984). En contraste con la abundante información encontrada en el invertebrado, son pocos los trabajos que estudian los factores que determinan la epimastigogénesis *in vitro*.

Recientemente, trabajando con tripomastigotas tipo hemático de *T. cruzi* incubadas por tiempos diferentes a 27 °C en medios de cultivo, nuestro grupo analizó el papel de un gradiente de tensiones de oxígeno sobre los cambios morfológicos que ocurren durante la cinética de transformación encontrando que los eventos de diferenciación que ocurren en condiciones de alto y bajo tenor de oxígeno 2.5 y 83 mm, respectivamente) son diferentes. En alto tenor de oxígeno predomina las formas redondeadas sin flagelo, mientras que en bajo tenor de oxígeno rápidamente aparecen los epimastigotas típicos y que las formas redondeadas de ambas condiciones son resistentes a la actividad del complemento. Las condiciones extremas se identificaron como epimastigogénesis horizontal (alto tenor de oxígeno) y vertical (bajo tenor de oxígeno) (Contreras y col. 2005). El análisis de los cambios morfológicos, peptídicos, glicopeptídicos y antigénicos durante la epimastigogénesis vertical mostró una morfología de transición asociada a cambios moleculares entre el tripomastigota y el epimastigota y que antes de completar su diferenciación morfológica se expresan proteínas, glicoproteínas y antígenos característicos del estadio epimastigota, sugiriendo que la expresión génica antecede la diferenciación

morfológica (De Lima y col., 2005). Similares resultados fueron obtenidos trabajando con un medio semidefinido químicamente. El análisis de las proteasas durante la epimastigogénesis vertical mostró que se expresan diferencialmente con aumento significativo de la actividad de cisteín proteasas, mientras que las metaloproteasas sólo se expresaron una vez culminada la diferenciación publicación en preparación). El estudio de la epimastigogénesis horizontal mostró que la morfología de transición amastigota) se mantiene por un tiempo mucho mayor que en la condición vertical, la cual también está asociada a perfiles peptídico, glicopeptídico y antigénico de transición, completándose la diferenciación molecular hacia epimastigotas más tardíamente.

El estado actual de la epimastigogénesis de *T. cruzi* indica que es una área de investigación que demanda mayores estudios por cuanto no sólo la caída de temperatura parece determinar este proceso de transformación. Es evidente que la simulación *in vitro* no está tomando en consideración una serie de factores que se intuye sean importantes en el vector, como son que la diferenciación está ocurriendo en un ambiente con alta viscosidad y densidad, pobre en glucosa y altamente hipertónico ya que en las primeras cuatro horas, el intestino del insecto elimina más del 50% del agua de la ingesta sanguínea y la glucosa sanguínea es completamente absorbida en las primeras 12 horas de digestión del triatomino.

Metacicloogénesis en el vector e inducida *in vitro*.

El ciclo vital de *T. cruzi* inicialmente propuesto, dividía el ciclo en el invertebrado en tres fases: una estomacal, con transformaciones evolutivas poco acentuadas; una fase intestinal donde los parásitos se transforman en epimastigotas que se multiplican activamente, y una fase rectal en la cual los epimastigotas de menor tamaño se adhieren a las crestas quitinosas de la porción final del tracto intestinal donde se generan los tripomastigotas metacíclicos infectivos. La secuencia de eventos de la metacicloogénesis en el vector, tiene dos enfoques: a) que los metacíclicos se derivan directamente de epimastigotas (Brumpt, 1912); y b) el de Elkeless (1940), que describe en cultivo y en triatominos, (la génesis de los metacíclicos a partir de elementos redondeados amastigotas de 2^{do} orden y micro-

amastigotas). Esta observación fue confirmada por Brack (1968), proponiendo que los metacíclicos se derivan de los esferomastigotas. Alvarenga y Brenner (1978), analizaron estos eventos en el vector y concluyeron que los metacíclicos podían derivarse de epimastigotas o de esferomastigotas, conclusión confirmada posteriormente por otros autores (García y Azambuja, 1991). La ruta de metacicloogénesis más estudiada es la transformación directa de epimastigotas en metacíclicos; sin embargo, hay evidencias que indican que los metacíclicos pueden derivarse en el triatomino de esferomastigotas y más raramente a partir de divisiones desiguales, formas tipo-anillo y células gigantes las cuales no han sido investigadas en profundidad (Kollien y Schaub, 2000) y donde deben participar múltiples factores.

En los primeros intentos de inducir la metacicloogénesis en condiciones axénicas, se propuso que en medios envejecidos este proceso podía dispararse por la acumulación de un metabolito durante el crecimiento del epimastigota (Camargo, 1964). En la búsqueda de factores disparadores de la metacicloogénesis se emplearon extractos de lepidópteros y triatominos (Wood y Pipkin, 1969; Wood y Sousa, 1976), cambios en el tenor de glucosa en los medios, modificaciones de pH y del tenor de CO₂ (Cáceres y Fernandes, 1976; Adroher y col., 1988; Ucros y col., 1983) encontrándose que esos factores contribuían al proceso de metacicloogénesis. Posteriormente, usando un medio químicamente definido que simula la orina artificial del triatomino Medio TAU) suplementado con L-Prolina, se demostró que la escasez nutricional actúa como el factor desencadenante de la diferenciación (Contreras y col., 1985a, 1985b), confirmado por Homsy y col. (1989) y por Krassner y col. (1990a, 1990b), quienes además demostraron la importancia de cationes mono y divalentes en el microambiente para asegurar el proceso de diferenciación. Hay evidencias indicando que péptidos residuales de la hemoglobina actúan sobre un receptor en los epimastigotas y activan la formación de AMPc que desencadena la metacicloogénesis (Fraindenraich y col., 1993), lo que debe tener importancia para la diferenciación en el vector. Es un hecho conocido que cepas de *T. cruzi* mantenidas por largo tiempo en cultivo atenúan su virulencia y reducen su capacidad de producir metacíclicos espontáneos en

cultivos e inducidos *in vitro* (Chiari, 1975; Contreras y col., 1998). Siendo la metacicloogénesis un proceso de diferenciación que garantiza el mantenimiento del parásito en la naturaleza, no deben existir aislados sin capacidad de metacicloogénizar; lo que indica la importancia de las condiciones de mantenimiento de los parásitos en el laboratorio para obtener estadios equivalentes a los naturales. Recientemente nuestro grupo encontró que cepas mantenidas por largo tiempo en cultivo, cuando fueron crecidas en medios con alto y medio tenor de glucosa, presentaron un consumo más acelerado de la glucosa del medio y ausencia de metacíclicos espontáneos; contrastando con el comportamiento de cepas y clones mantenidos por pases alternos triatomo/vertebrado, lo que confirma la adaptación del parásito al medio de cultivo. Se encontró además, que la competencia de los epimastigotas para metacicloogénizar está relacionada con la capacidad de producir amoníaco al final de la fase exponencial del crecimiento, la cual se pierde por mantenimiento prolongado en cultivo y es revertida cultivando los parásitos en medios con bajo tenor de glucosa restituyéndose concomitantemente la capacidad metacicloogénizante De Lima y col., (en preparación). Este hallazgo permite explicar la ausencia de metacíclicos espontáneos en los cultivos y su extensión práctica es que facilita la producción masiva de metacíclicos al incrementar el rendimiento en experimentos de metacicloogénesis inducida *in vitro* en condiciones químicamente definidas.

Actualmente los estudios de metacicloogénesis de *T. cruzi* están orientados en la caracterización de proteínas liberadas durante el proceso de diferenciación (Duschak y col., 2006), conocer los mecanismos involucrados en regulación de la expresión génica que ocurren cuando el epimastigota no infectivo se transforma en metacíclico infectivo y las implicaciones de este evento en la enfermedad de Chagas (Krieger y col., 1999; Rodrigues-Ávila y col., 2003; Yamada-Ogatta y col., 2004). En este nivel de análisis es de fundamental importancia que los metacíclicos obtenidos *in vitro* sean fidedignos con los obtenidos en la orina del vector.

Amastigogénesis intracelular y extracelular

La transformación tripomastigota metacíclico o sanguíneo de *T. cruzi* en amastigota (amastigogénesis) ocurre intracelularmente en el vertebrado

a 37 °C, desconociéndose si el proceso es igual para ambos tripomastigotas. Dvorak (1975), estudió *in vitro* el ciclo del parásito en el vertebrado, la comparación de tripomastigotas tipo-hemático y metacíclicos no mostró diferencias significativas. El autor dividió los eventos en cinco etapas: a) una fase de penetración de la célula; b) una de reorganización de los tripomastigotas en amastigotas; c) una de reproducción del amastigota; d) una de diferenciación del amastigota en tripomastigota; y e) una fase final de escape de los tripomastigotas. En consecuencia a la asincronía de los eventos anteriores, pueden quedar amastigotas y formas en transformación secuestrados dentro de restos celulares. Estas fases han sido estudiadas en detalle encontrándose que cada una de ellas es el producto de una secuencia de eventos altamente complejos donde participan activamente el parásito y la célula como se detalla en la revisión de De Souza (2002). También se ha demostrado que en el proceso de multiplicación de amastigotas participan proteasas del parásito y que este proceso puede ser bloqueado con inhibidores específicos (Meirelles y col., 1992; Cazzulo y col., 1994).

La observación de formas redondeadas de *T. cruzi* en algunos hemocultivos y en el intestino anterior de insectos recientemente alimentados (revisión de Pan, 1975), identificados como formas tipo-amastigotes *amastigotes-like*) dio pie a que inicialmente la amastigogénesis extracelular fuese un modelo profundamente cuestionado, particularmente con la publicación de protocolos para la obtención de "amastigotas" a temperatura ambiente en presencia de células del insecto, hemolinfa o plasma de diferentes animales (Wood y Pipkin, 1969; Lanar, 1979). La significación biológica de la amastigogénesis en estos protocolos de simulación *in vitro* fue determinada por la permanencia de los amastigotas en repiques sucesivos a 37 °C y la diferenciación hacia tripomastigotas tipo hemático. Pan (1975) refiere la obtención de amastigotas replicativos a 37 °C suplementando un medio químicamente semi-definido con altas concentraciones de vitaminas. Se cuestiona que en estos experimentos, los inóculos de partida usaron epimastigotas y un alto porcentaje de amastigotas se logró de 8 repiques sucesivos. Sin embargo, esos amastigotas dieron infección sub-patente en ratones e infectaron un bajo porcentaje de células *in vitro* después de 7 días a

35,5°C. Lanar 1979), partiendo de tripomastigotas sanguíneos de *T. cruzi* incubados a 28° C, en un medio empleado en el cultivo de células embrionarias de insecto, al cabo de 48 horas obtuvo un alto porcentaje de formas extracelulares redondeadas con capacidad de multiplicarse, resistentes a la actividad lítica del complemento, capaces de infectar ratones a las cuales denominó "estafilomastigotas". La obtención de estos "amastigotas" a 28 °C y no a 37 °C le resta significación biológica, aún cuando estudios posteriores demostraron que los estafilomastigotas tenían tres polipéptidos dominantes en su superficie, uno común con los tripomastigotas hemáticos, otro común con los amastigotas y uno específico no presente en los otros estadios (Lanar y Manning, 1984), lo que coincide con los eventos de diferenciación observados en nuestros trabajos de epimastigogénesis.

Varios investigadores han reportado la diferenciación axénica de tripomastigotas hemáticos en amastigotas implicando a varios factores como estimuladores de esa transformación. Kimura y col. (1978), partiendo de formas metacíclicas de *T. cruzi* obtenidas de cultivo y tratadas con complemento a 37 °C, obtuvieron amastigotas extracelulares al incubarlos a temperatura ambiente en plasma reconstituido de rata, donde en algunas cepas los amastigotas extracelulares dieron origen a tripomastigotas tipo-hemático. Silva y col. (1984), purificando metacíclicos de *T. cruzi* cultivados en medio LIT a 29 °C, obtuvieron esferomastigotas por tratamiento en suero fresco de cobayo a 37 °C e inmediata transferencia en medio LIT a 29 °C, alcanzando un 100% de formas redondeadas con capacidad multiplicativa al cabo de 8 días. Estos esferomastigotas fueron resistentes a complemento y podían ser sub-cultivados indefinidamente manteniendo su morfología a 29 °C, durante el sub-cultivo apreciaron formas epimastigotas y tripomastigotas aunque en bajos porcentajes. Zaidenberg (1985), demostró que medios sintéticos suplementados con plasma humano o de pollo y algunas de sus proteínas inducen la transformación de epimastigotas hacia amastigotas extracelulares. Posteriormente, propuso la hipótesis que el ciclo de *T. cruzi* *in vivo*, tanto en el huésped infectado como en el insecto vector esta regulado por una secuencia genética del parásito que sigue el orden epimastigota, formas progresivas, tripomastigota, amastigota, for-

mas regresivas y nuevo ciclo (Zaidenberg, 2004). El primer estudio sistemático mostrando la validez del modelo de diferenciación y el papel del ambiente ácido en la transformación extracelular de tripomastigotas en formas redondeadas semejantes a amastigotas fue reportado por Kambara y col. (1990). Posteriormente, Tomlinson y col. (1995), demostraron la relevancia fisiológica de la caída de pH para inducir la transformación extracelular a 37 °C de tripomastigotes tipo hemático en amastigotas, acompañado a la expresión de un antígeno de superficie estadio específico equivalente al expresado por amastigotas naturalmente transformados.

Con el desarrollo de un protocolo para la obtención de amastigotas extracelulares a partir de metacíclicos (Contreras y col., 2002) y la confirmación de los resultados de Tomlinson y col. (1995), nuestro grupo de trabajo propuso vías diferentes de amastigogénesis: una identificada como amastigogénesis extracelular primaria (AEP) para inducir amastigotas extracelulares a partir de metacíclicos y otra identificada como amastigogénesis extracelular secundaria (AES) para producir amastigotas extracelulares a partir de tripomastigotas tipo-hemático, dejando implícita la existencia de amastigotas diferentes en el ciclo de *T. cruzi*. Esta propuesta fue posteriormente confirmada por Navarro y col. (2003) al demostrar que los amastigotas primarios y secundarios difieren en su morfología fina, expresión génica y antigénica y en sus propiedades biológicas al responder a protocolos de inducción diferentes. Ambos amastigotas, resisten complemento y colonizan macrófagos de perro y ratón *in vitro* e infectan animales de laboratorio. Un análisis detallado en nuestras investigaciones indican que además de la temperatura, otros factores juegan papel determinante en la AEP tales como densidad y viscosidad del medio, osmolaridad, tensión de oxígeno, adherencia, y presencia de un factor en el suero el cual hace competente al metacíclico para diferenciarse en amastigota, mientras que otros factores dentro de ciertos rangos fisiológicos no tienen el mismo peso para inducir la diferenciación entre ellos el pH ácido y el tamaño de inóculo.

Tripomastigogénesis.

Los eventos de transformación del estadio amastigota en tripomastigota (tripomastigogénesis)

ocurren intracelularmente a temperatura de 37 °C. Rodríguez y Marinkelle (1970) estudiando en células *in vitro* el origen del polimorfismo de los tripomastigotas sanguíneos, detallaron los tres procesos descritos por otros autores por los cuales el amastigota se transforma en tripomastigota y ellos son: a) progresión directa donde el amastigota se alarga, el cuerpo gira sobre su eje transversal llevando el kinetoplasto y la inserción del flagelo hacia la parte posterior formándose así el tripomastigota sin pasar por la morfología epimastigota; b) progresión indirecta, orbicular o desplegamiento por el cual el amastigota forma un esferomastigota de mayor tamaño con flagelo corto y una vacuola lateral entre el núcleo y el kinetoplasto, la cual se abre formando por desplegamiento un tripomastigota corto y ancho sin pasar por la forma epimastigota y; c) progresión por elongación por el cual los amastigotas se alargan formando un epimastigota, luego el kinetoplasto se mueve desde la porción anterior a la posterior del cuerpo formando el tripomastigota.

Transformación por elongación es el proceso universalmente aceptado para la tripomastigogénesis, toma varias horas en las cuales ocurren cambios en la organización general de la célula, en la estructura del kinetoplasto y en el flagelo y existe poca información sobre el estímulo que dispara este proceso (De Souza, 2002). Zavala-Castro y col. (1995), proponen que el incremento de AMPc intracelular mediada por receptores betaadrenérgicos induce la tripomastigogénesis. Faucher y col., (1995), dieron evidencias concluyentes sobre la existencia de una forma tipo-epimastigota en menos de 1% de las células infectada usando un anticuerpo monoclonal específico para epimastigotas. Almeida de Faria y col. (1999), demostraron la presencia de una forma tipo-epimastigota transitoria como intermediario en la diferenciación de amastigotas a tripomastigotas, proponiendo identificarla como epimastigota intracelular el cual es un estadio de transición obligatorio cuyo tiempo de permanencia en el citoplasma de la célula hospedadora es dependiente de las condiciones medioambientales. Más recientemente Tonelli y col. (2004), trabajando con un linaje de células dependiente de L-prolina cultivada a 33 °C lograron arrestar la diferenciación de amastigota en epimastigota intracelular y restauraron su culminación hacia tripomastigota suplementando el medio con L-prolina,

demostrando por primera vez que la L-prolina es un aminoácido esencial para la tripomastigogénesis intracelular, avalado por el hecho que el pool interno de este aminoácido es diferente en amastigotas 8.1 µM, tripomastigotas 3.8 µM) y epimastigotas intracelulares 0.45 µM).

Tripomastigogénesis en condiciones axénicas es el proceso de diferenciación menos estudiado. Pan (1971), reporta que trabajando con epimastigotas crecidas en un medio conteniendo de plasma de pollo fresco no inactivado) obtuvo un alto porcentaje de tripomastigotas tipo-sanguíneo a las 48 horas de incubación a 35.5 °C. El autor asoció este resultado a la presencia de factores promotores de tripomastigogénesis más que a la temperatura por cuanto podían obtener a menor temperatura 29.5 °C) un alto porcentaje de tripomastigotas en el primer sub-cultivo siempre y cuando estuviera presente el plasma de pollo. Kimura y col. (1978), trabajando con formas metacíclicas de ocho cepas diferenciadas en amastigotas en medio LIT a 27 °C, reportaron que las cepas bajo ciertas condiciones se transforman en tripomastigotas cortos y gruesos los cuales son morfológicamente diferentes de los tripomastigotas metacíclicos. Ellos propusieron que cambios bioquímicos progresivos en el medio, aún desconocidos o la influencia de las condiciones previas de mantenimiento de la cepa podrían eventualmente ser responsables por la aparición o no de tripomastigotas tipo sanguíneo. Rondinelli y col (1988), reportaron la obtención del ciclo completo de *T. cruzi* en condiciones axénicas a 29 °C. Ellos obtuvieron esferomastigotas a partir de formas metacíclicas y reportaron que la epimastigogénesis y la tripomastigogénesis podían inducirse variando la concentración del suero en el medio de cultivo y la temperatura de incubación. Los autores concluyeron que la alta concentraciones de suero y temperatura de 37°C inducen la tripomastigogénesis y que factores del suero responsables por la tripomastigogénesis se desconocen. Nuestro grupo, trabajando con amastigotas primarios y secundarios en medio MEMTAU no ha logrado inducir tripomastigogénesis ya que los amastigotas primarios cuando son mantenidos a 37 °C por varios días sin cambios de medio, siguen dos vías: la mayoría de los amastigotas reducen su tamaño formando microamastigotas y la otra parte forman agregados de amastigotas multiplicativos que se transforman y

multiplican en epimastigotas a 37 °C; mientras que los amastigotas secundarios se transforman rápidamente en epimastigotas con igual comportamiento biológico que los derivados de amastigotas primarios.

CONCLUSIONES Y NUEVA HIPÓTESIS

De esta revisión se puede concluir que es posible simular los cuatro procesos de diferenciación epimastigogénesis, metacicloogénesis, amastigogénesis y tripomastigogénesis en condiciones axénicas. Sin embargo, la reproducibilidad de los procesos de forma tal que sean equivalentes a los que ocurren durante el ciclo vital natural de *Trypanosoma cruzi* aún está lejos de ser alcanzada por cuanto cada proceso de diferenciación parece ser el producto de una sincronización en tiempo (estatus metabólico o competencia del estadio) y espacio (condiciones microambientales o factores) conformando una sumatoria de procesos multifactoriales (factores endógenos y exógenos) que demanda un conocimiento detallado de lo que ocurre en el ciclo vital *in vivo* para garantizar estadios *bona fide*. Con los avances en genómica y proteómica funcional, es posible que a corto plazo se tengan respuestas que aseguran una mejor comprensión del ciclo de este parásito. Los planteamientos revisados parecen indicar que a) multiplicación y diferenciación son procesos excluyentes; b) cada estadio precedente debe estar competente para diferenciarse; c) cada proceso no representa una diferenciación terminal; d) el factor disparador de la diferenciación del estadio competente está representando un estrés microambiental

y; e) los eventos que ocurren en el invertebrado y en el vertebrado son equivalentes. A manera de corolario surge una hipótesis de trabajo que incluye las observaciones recientes indicando “que la secuencia de eventos morfológicos en el vector y en vertebrado son equivalentes y difieren en la velocidad del proceso de diferenciación como función de la temperatura”. Bajo esa hipótesis de trabajo, a la temperatura del vector la secuencia morfológica sería: tripomastigota hemático, amastigota extracelular, epimastigota extracelular, tripomastigota extracelular ó metacíclico, mientras que a temperatura del vertebrado la secuencia sería tripomastigota metacíclico y hemático, amastigota intracelular, epimastigota intracelular, tripomastigota intracelular ó hemático. La secuencia de diferenciación en el vector serían: amastigogénesis extracelular, epimastigogénesis extracelular, metacicloogénesis ó tripomastigogénesis extracelular, y en el interior celular sería: amastigogénesis intracelular, epimastigogénesis intracelular, tripomastigogénesis intracelular. Esta hipótesis deja abierta la posibilidad de que los factores disparadores de diferenciación sean comunes. A título de ilustración la dependencia de L-prolina en la transformación de epimastigotas intracelulares en tripomastigotas es común con la metacicloogénesis disparada por estrés nutricional en medio TAU suplementado con ese aminoácido. En procesos de diferenciación similares, las familias génicas que se expresan podrían diferir ó no. Esta concepción de los eventos de diferenciación facilitaría nuevos abordajes para la búsqueda de factores disparadores de diferenciación en *Trypanosoma cruzi*.

LITERATURA CITADA

- ADROHER, F. J., J. A. LUPIAÑEZ Y A., OSUNA.
1988. Influence of saccharides and sodium chloride on growth and differentiation of *Trypanosoma cruzi*. *Cell Differentiatio n*, 22: 165-170.
- ALMEIDA DE FARIA, M., E. FREYMULLER, W. COLLI Y M. ALVES
1999. *Trypanosoma cruzi*: characterization of an intracellular epimastigote-like form. *Exp. Parasitol.*, 92: 263-274.
- ALVARENGA, N. J. Y Z. BRENER
1978. Developmental of *Trypanosoma cruzi* in the vector in the absence of blood. *Acta Tropica*, 35:315-317.
- AZAMBUJA, P., J. GUIMARÃES Y E. GARCIA
1983. Haemolytic factor from the crop of *Rhodnius prolixus*: evidence and partial characterization. *J Insect. Physiol.*, 29: 833-837.
- AZAMBUJA, P., C. MELLO, I. DÉSCOFFIER Y E. GARCIA
1989. *In Vitro* citotoxicity of *Rhodnius prolixus* hemolytic factor and mellitin towards different trypano-somatids. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 22: 597-599.
- AZAMBUJA, P., D. FEDER, Y E. GARCÍA.
2004. Isolation of *Serratia marcescens* in the midgut of *Rhodnius prolixus*: impact of the establishment of the parasite *Trypanosoma cruzi* in the vector. *Exp. Parasitol.*, 107:89-96.
- BOURGUIGNON S., C. MELLO, D. SANTOS, M.GONZALEZ Y T. SOUTO-PADRON
2006. Biological aspects of the *Trypanosoma cruzi* Dm28c clone) intermediate form, between epimastigote and trypomastigote, obtained in modified liver infusion tryptose LIT) medium. *Acta Trop.*, 98:103-109.
- BRACK, C.
1968. Elektronemikroskopische untersuchungen zum-lebenszyklus von *Trypanosoma cruzi*. Unter besonderer berucksichtigung der entwicklungs for men in uber trager *Rhodnius prolixus*. *Acta Tropica*, 25: 289-356.
- BRENER, Z.
1973. Biology of *Trypanosoma cruzi*. *Ann. Rev. Microbiol.*, 27: 347-382.
- BRENER Z.
1972. A new aspect of *Trypanosoma cruzi* life-cycle in the invertebrate host. *J Protozool.* 19: 23-27.
- BRUMPT,
1977. Trypanosomatidae Genero *Trypanosoma* (*Schizo-trypanum*) *cruzi* e Molestia de Chagas (301-307). En: *Parasitologia Médica*. Pessoa, & Vianna-Martins. Guanabara Koogans Eds. 10° Ed. R. de Janeiro. Brasil.
- CACERES, O. Y J. FERNANDES
1976. Glucose metabolism, growth and differentiation of *Trypanosoma cruzi*. *Rev. Brasil. Biol.*, 36: 397-410
- CAMARGO, E. P.
1964. Growth and differentiation in *Trypanosoma cruzi*: I. Origin of metacyclic trypanosomes in liquid media. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo*, 6:93-100.
- CAZZULO, B., J. MARTINEZ, M.NORTH, G. COOMBS Y J. CAZZULO
1994. Effects of proteinase inhibitors on the growth and differentiation of *Trypanosoma cruzi* *FEMS-Microbiol. Letters*. 124: 81-86
- CHIARI, E.
1975. Differentiation of *Trypanosoma cruzi* in culture. In: new Approaches in American Trypanosomiasis research. *Proceeding of an International Symposium P.A.H.O. Sci Publ.*, 318: 144-145.
- CONTRERAS, V., A. DE LIMA Y G. ZORRILLA
1998. *Trypanosoma cruzi*: Maintenance in culture modify gene and antigenic expression of metacyclic trypomastigotes. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 93: 753-760.
- CONTRERAS, V., M. NAVARRO, A. DE LIMA, F. DURAN, R. ARTEAGA Y Y. FRANCO
2002. Early and late molecular and morphologic changes that occur during the in vitro transformation of *Trypanosoma cruzi* metacyclic trypomastigotes to amastigotes. *Biol. Res.*, 35: 21-32.
- CONTRERAS, V., J. SALLES, N. THOMAS, C. MOREL Y S. GOLDENBERG
1985b. *In vitro* differentiation of *Trypanosoma cruzi* under chemically defined conditions. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 16: 123-133.
- CONTRERAS, V., C. MORE, Y S. GOLDENBERG
1985a. Stage specific gene expression precedes morphological changes during *Trypanosoma cruzi* metacyclo-genesis. *Mol. Biol. Parasitol.*, 14: 83-96.
- CONTRERAS, V., R. ARTEAGA, D. GRATEROL, A. DE LIMA, M. FARÍAS, W. PINEDA Y M. NAVARRO
2005. Epimastigogénesis de *Trypanosoma cruzi* en medio axénico: Factores relevantes. LV Convención Anual de AsoVAC. 20 al 25 de Noviembre. Caracas, Venezuela.
- DE LIMA, A., D. GRATEROL, R. ARTEAGA, M. FARÍAS, W. PINEDA, M. NAVARRO Y V. CONTRERAS
2005. Cambios morfológicos, peptídicos y glicopeptídicos durante la epimastigogénesis de *Trypanosoma cruzi* en medio axénico. LV Convención Anual de AsoVAC. 20 al 25 de Noviembre. Caracas, Venezuela.
- DE SOUZA, W.
1984. Cell biology of *Trypanosoma cruzi*. *Int. Rev. Cytol.*, 86:197-283.
1999. A Short Review on the Morphology of *Trypanosoma cruzi*: from 1909 to 1999. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 94: 17-36.
2002. From the cell biology to the development of new chemotherapeutic approaches against trypano-somatids: dreams and reality. Review. *Kinetoplastid Biol Dis.*, 1: 1-21. Published online 2002 May 31. <http://www.kinetoplastids.com/content/1/1/3>.

- DEANE, M., P. MORIEARTY Y Z. THOMAZ
1984. Cell differentiation in trypanosomatids and other parasitic protozoa. In: *Genes and Antigens of parasites. A Laboratory Manual*. 2nd ed. Morel CM Editor. (11-21). The Proceedings of a Course Sponsored by UNDP/WORLD BANK/WHO .
- DIAS, E.
1934. Estudos sobre o *Schyzotrypanum cruzi*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 79: 19-24.
- DUSCHAK, V., M. BARBOZA, G. GARCIA, E. LAMMEL, A. COUTO Y E. ISOLA
2006. Novel cysteine proteinase in *Trypanosoma cruzi* metacyclogenesis. *Parasitology*, 132:345-55.
- DVORAK, J. A.
1975. New in vitro approach to quantitation of *Trypanosoma cruzi*-vertebrate cell interaction. In: *New Approaches in American Trypanosomiasis Research. Proceedings of an International Symposium P.A.H.O. Sci. Publ.*, 318: 109-145.
- ELKELESS, G.
1940. en Silva, LHP. 1959. Observações sobre o ciclo evolutivo de *Trypanosoma cruzi*. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo*, 1: 99-118.
- FAUCHER, J., T. BALTZ Y K. PETRY
1995. Detection of an "epimastigote-like" intracellular stage of *Trypanosoma cruzi*. *Parasitol. Res.*, 81:441-443.
- FRAIDENRAICH, D., C. PEÑA, E. ISOLA, E. LAMMEL, O. COSO, A. DIAZ, S. PONGOR, F. BARALLE, H. TORRES Y M. FLAWIA
1993. Stimulation of *Trypanosoma cruzi* adenyl cyclase by an a-D-globin fragment from *Triatoma hindgut*: Effect on differentiation of epimastigote to trypomastigote forms. *P.N.A.S. USA*, 90: 10140-10144.
- GARCIA, E. & P. AZAMBUJA
1991. Development and interactions of *Trypanosoma cruzi* within the insect vector. *Parasitol. Today*, 8: 240-244.
- GARCIA, E., M. GONZALEZ, P. AZAMBUJA, F. BARALLE, D. FRAINDERAICH, H. TORRES Y M. FLAWIA
1995. Induction of *Trypanosoma cruzi* metacyclogenesis in the hematophagous insect vector by hemoglobin and peptides carrying alpha-D-globin sequences. *Exp. Parasitol.*, 81: 255-261.
- HOMSY, J., B. GRANGER Y S. KRASSNER
1989. Some factors inducing formation of metacyclic stages of *Trypanosoma cruzi*. *J. Protozool.*, 36: 150-153.
- KAMBARA, H., H. UEMURA, S. NAKAZAWA Y T. FUKAMA
1990. Effect of low pH on transformation of *Trypanosoma cruzi* trypomastigote to amastigote. *Japan J. Parasitol.*, 39: 226-228.
- KIMURA, E., W. LAY Y J. FERNANDEZ
1978. Extracellular *in vitro* evolution of metacyclic trypomastigotes isolated from *Trypanosoma cruzi* cultures. *Rev. Inst. Med. Trop.*, 20: 133-138.
- KOLLIEN, A. Y G. SCHAUB
1998a. *Trypanosoma cruzi* in the rectum of the bug *Triatoma infestans*: Effect of blood ingestion by the starved vector. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 59: 166-170.
1998b. The development of *Trypanosoma cruzi* Trypanosomatidae) in the reduviid bug *Triatoma infestans* Insecta): Influence of starvation. *J. Eukaryot. Microbiol.*, 45:59-63.
2000. The development of *Trypanosoma cruzi* in triatominae. *Parasitol. Today*, 16:381-387.
- KRASSNER, S., B. GRANGER, P. LEE, C. GUERRA, T. LE Y K. LUC
1990a. Action of exogenous potassium and calcium ions on *in vitro* metacyclogenesis in *Trypanosoma cruzi*. *J. Protozool.*, 38: 602-608.
1990b. Further studies on substrates inducing meta-cyclogenesis in *Trypanosoma cruzi*. *J. Protozool.*, 37: 128-132.
- KRIEGER, M., A. RODRIGUES-ÁVILA, S. YAMADA-OGATTA, S. PLAZANET-MENUT Y S. GOLDENBERG
1999. Differential Gene Expression during *Trypanosoma cruzi* metacyclogenesis *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 94: 165-168.
- LACOMBE, D.
1980. Fase extra-intestinal do ciclo evolutivo do *Trypanosoma cruzi* em *Triatoma infestans*. *Rev. Brasil. Biol.*, 40: 525-535.
- LANAR, D.
1979. Growth and differentiation of *Trypanosoma cruzi* cultivated with a *Triatoma infestans* embryo cell line. *J. Protozool.*, 26: 457-462.
- LANAR, D., Y J. MANNING
1984. Major surface proteins and antigens on the different *in vivo* and *in vitro* forms of *Trypanosoma cruzi*. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 11: 119-131.
- LENZI, H., A. JANSEN Y M. DEANE
1984. The recent discovery of what might be a primordial escape mechanism for *Trypanosoma cruzi*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 79: 13-18.
- MEIRELLES, M., L. JULIANO, E. CARMONA, S. SILVA, E. COSTA, A. MURTA Y J. SHARFSTEIN
1992. Inhibitors of the major cysteinyl proteinase GP57/51) impair host cell invasion and arrest the intracellular development of *Trypanosoma cruzi in vitro*. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 52: 175-184.
- MELLO, C., P. AZAMBUJA, E. GARCIA Y N. RATCLIFFE
1996. Differential *in vitro* and *in vivo* behavior of three strains of *Trypanosoma cruzi* in the gut and hemolymph of *Rhodnius prolixus*. *Exp. Parasitol.*, 82: 112-121.
- NAVARRO M., A. DE LIMA, J. ASKUE Y V. CONTRERAS
2003. Morphological comparison of axenic amastigogenesis of trypomastigotes and metacyclic forms of *Trypanosoma cruzi* *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 98: 83-91.

OPS/OMS.

2004. <http://www.ops-oms.org.ve/site/venezuela/ven-site-salud-nuevo.htm>.

PAN, S. C.

1971. Cultivation and morphogenesis of *Trypanosoma cruzi* in improved liquid media. *J. Protozol.*, 18: 556-560.
1975. *In vitro* cultivation of amastigotes of *Trypanosoma cruzi* in cell-free media. En: New Approaches in American Trypanosomiasis Research. Proceedings of an International Symposium. *P.A.H.O. S.P.* 318: 121-126.

PETANA, W. B.

1972. A revision of *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi* strains from British Honduras, and the importance of strain characterization in experimental chemotherapy of Chagas' Disease. *Trans. Royal Soc. Trop. Med. Hyg.*, 66: 463-470.

RATCLIFFE, N., T. NIGAM, C. MELLO, E. GARCIA Y P. AZAMBUJA

1996. *Trypanosoma cruzi* and Erythrocyte Agglutinins: A Comparative Study of Occurrence and Properties in the Gut and Hemolymph of *Rhodnius prolixus*. *Exp. Parasitol.*, 83: 83-93.

RODRIGUES ÁVILA, A., B. DALLAGIOVANNA, S. YAMADA-OGATTA, V. MONTEIRO-GÓES, S. FRAGOSO, M. KRIEGER, Y.S. GOLDENBERG

2003. Stage-specific gene expression during *Trypanosoma cruzi* metacyclogenesis. *Genet. Mol. Res.*, 2: 159-168.

RODRÍGUEZ, E. Y C. MARINKELLE

1970. *Trypanosoma cruzi*: Development in tissue culture. *Exp. Parasitol.*, 27: 78-87.

RONDINELLI, E., R. SILVA, J. CARVALHO, C. SOARES, E. DE CARVALHO Y F. DE CASTRO

1988. *Trypanosoma cruzi*: an *in vitro* cycle of cell differentiation in axenic culture. *Exp. Parasitol.*, 66: 197-204.

SILVA, R., E. RONDINELLI, J. CARVALHO, E. CARVALHO, R. MOURA-NETO Y F. CASTRO

1984. Cultivo seriado de forma esferomastigota de *T. cruzi* em meio LIT. XI Reunião Anual. Pesquisa Basica em Doença de Chagas. Caxambu. 20-22 Novembro. Resumo BQ-14. Pag 69.

TOMLINSON, S., F. VANDEKERCHOVE, U. FREVERT Y V. NUSSENZWEIG

1995. The induction of *Trypanosoma cruzi* trypomastigote to amastigote transformation by low pH. *Parasitol.*, 110: 547-554.

TONELLI, R.R., A. SILBER, M. ALMEIDA-DE-FARIA, I.

HIRATA, W. COLLI Y M. ALVES

2004. L-proline is essential for the intracellular differentiation of *Trypanosoma cruzi*. *Cell. Microbiol.*, 6:733-41.

TYLER, K. Y D. ENGMAN

2001. The life cycle of *Trypanosoma cruzi* revisited. *Int. J. Parasitol.*, 31: 472-481.

2000. Flagellar elongation induced by glucose limitation is preadaptative for *Trypanosoma cruzi* differentiation. *Cell Motil Cytoskeleton* 46: 269-278.

UCROS, H., B. GRANGER Y S. KRASSNER

1983. *Trypanosoma cruzi*: Effect of pH on *in vitro* formation metacyclic trypomastigotes. *Act. Trop.*, 40: 105-112.

URDANETA-MORALES, S. Y N. NIRONI

1996. *Trypanosoma cruzi* in the anal glands of urban opossum. I- Isolation and experimental infections. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 91: 399-403.

WOOD, D. Y A. PIPIN

1969. Multiplication and differentiation of *Trypanosoma cruzi* in an insect cell culture system. *Exp. Parasitol.*, 24: 176-183.

WOOD, D. & O. SOUSA

1976. *Trypanosoma cruzi*: effects of *Rhodnius prolixus* extracts on *in vitro* development. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo*, 18: 93-96.

YAMADA-OGATTA S., M. MOTTA, H. TOMA, V. MONTEIRO-GOES, A. AVILA, B. MUNIZ, C. NAKAMURA, S. FRAGOSO, S. GOLDENBERG Y M. KRIEGER

2004. *Trypanosoma cruzi*: cloning and characterization of two genes whose expression is up-regulated in metacyclic trypomastigotes. *Acta Trop.*, 90:171-9.

ZAIDENBERG, A.

1985. *Trypanosoma cruzi*: Extracellular amastigote-resembling forms induced by chicken and human plasma. *Exp. Parasitol.*, 60: 211-228.

2004. Morfogenesis de *Trypanosoma cruzi* y amastigotas extracelulares. <http://www.sicisalud.com/dato/dat040/04o0613.htm>.

ZAVALA-CASTRO, J., E. GUZMAN-MARIN Y J. ZAVALA-VELAZQUEZ

1995. Adrenergic ligands trigger intracellular differentiation of *Trypanosoma cruzi*. *Arch. Med. Res.*, 26:449-50.

ZELEDÓN R., N. ALVARENGA Y K. SCHOSINSKY

1977. Ecology of *Trypanosoma cruzi* in the insect vector. Chagas' Disease Symposium Proceedings, Pan American Health Organization, Scientific Publication, 347:59-70.

ZELEDÓN, R.

1999. Some morphological and molecular aspects of the life cycle of *Trypanosoma cruzi* in the insect vector. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 94: 217-218.