

ALTERACIONES EN EL PATRÓN DE ENLAZAMIENTO DE LECTINAS EN EL RIÑÓN DE RATONES INFECTADOS EXPERIMENTALMENTE CON UNA CEPA VENEZOLANA DE *Trypanosoma evansi*

Lectin-Binding Pattern in the Kidney of Mice Experimentally Infected with a Venezuelan Strain of *Trypanosoma evansi*

Alpidio A. Boada-Sucre^{1,2}, Marcello S. Rossi. S.^{2,3}, Hilda De Stefano^{1,2}, Leonardo Sigales⁴ y Miren González-Elorriaga⁵

¹Instituto de Estudios Científicos y Tecnológicos. Universidad Simón Rodríguez. (IDECYT-USR), E-mail. aboada@hotmail.com, E-mail: hdestefa@strix.ciens.ucv.ve, Apdo. Postal: 47925. Caracas 1041-A. ²Postgrado en Zoología, Universidad Central de Venezuela. ³Laboratorio de Inmunología y Quimioterapia, Instituto de Biología Experimental, Universidad Central de Venezuela. Caracas, Venezuela. E-mail: didinium2001@yahoo.com. ⁴Facultad de Ciencias, Universidad Central de Venezuela.

⁵Centro de Microscopía Electrónica, Universidad Central de Venezuela, Caracas, Venezuela.

RESUMEN

El *Trypanosoma evansi* es un hemoparásito que ocasiona la tripanosomosis equina en Venezuela. Esta enfermedad cursa con un incremento en la temperatura corporal, anemia, debilidad, parálisis y en algunos casos la muerte. Los mecanismos celulares del proceso infeccioso no se conocen con exactitud y pueden involucrar a los glicoconjugados de superficie del parásito y del hospedador. El propósito del presente estudio fue determinar las diferencias en el patrón de enlazamiento de las lectinas: sCon A, sWGA, PNA, SBA, UEA-I, LFA, SNA, y MAL-II en el riñón de ratones sanos e infectados con *T. evansi*. Para ello se realizó el marcaje sobre cortes en parafina de riñón utilizando el método del Complejo Avidina-Biotina (ABC). En controles se observó una reacción de moderada a intensa del endotelio glomerular con LFA, SNA y MAL-II mientras que en los animales infectados la reacción fue intensa. Los controles no experimentaron marcaje con sConA, sWGA, PNA y SBA a la vez que los infectados mostraron reacción mínima. El endotelio glomerular de los animales infectados no experimentó cambios en el enlazamiento de UEA-I con respecto a los controles. En los animales infectados, los eritrocitos y los túbulos contorneados proximales incrementaron su reactividad con SNA, y los componentes de la matriz extracelular con UEA-I. El marcaje con sWGA en la cápsula Bowmann de los riñones de animales infectados disminuyó con respecto a los controles. Estos resultados sugieren que en ratones infectados, los tripanosomas vivos o muertos pueden liberar

componentes que alteran el patrón de glicoconjugados en las membranas celulares del riñón.

Palabras clave: Ratón, *Trypanosoma evansi*, lectinas, riñón, microscopía de luz.

ABSTRACT

Trypanosoma evansi is the aetiological agent of equine trypanosomosis in Venezuela. This disease causes an increment in body temperature, anaemia, weakness and paralysis, finally causing the death of the host. The cellular mechanisms involved in the infectious process is not known and may involve the growth of superficial glycoconjugates with characteristic sugar residuals on the surfaces of both host and trypanosomes. The aim of the present study was to determine possible differences in the binding patterns of lectins: sCon A, sWGA, PNA, SBA, UEA-I, LFA, SNA, and MAL-II in kidneys of healthy mice and mice infected with *T. evansi*. Sections of infected and control mice kidneys were labelled according to the Avidine-Biotine Complex (ABC) method. In controls and infected animals an intense reaction in the glomerular endothelium was observed with: LFA, SNA and MAL-II, and a low to moderate reaction with sCon A, sWGA, PNA, SBA, and UEA-I. In infected animals, the red blood cells and the Henle loop showed increased reactivity with SNA, and the components of the extracellular matrix with UEA-I. In infected animals the binding with SNA in the proximal convolute tubules and with PNA and sWGA in the renal capsule was reduced. These results suggest that in infected mice, living or dead trypanosomes might liberate

biologically active products that alter the pattern of the glycoconjugates in the cell membranes of the kidney.

Key words: Mice, *Trypanosoma evansi*, lectins, kidney, light microscopy

INTRODUCCIÓN

En Venezuela la tripanosomosis animal es causada principalmente por *Trypanosoma vivax* y *Trypanosoma evansi*. El *T. vivax* es el agente etiológico de la tripanosomosis bovina, ovina y caprina, mientras que el *T. evansi* es el agente causante de la tripanosomosis equina [1] conocida como derrengadera [2]. Esta enfermedad se manifiesta con un incremento en la temperatura corporal, anemia, debilidad y paresia del tren posterior conduciendo en algunos casos a la muerte del animal [2].

El mecanismo de transmisión de este parásito, es mecánico y llevado a cabo por moscas hematófagas del género *Stomoxys* spp, *Tabanus* spp y vampiros de la especie *Desmodus rotundus* [2, 3]. Los daños causados por los tripanosomas a sus hospedadores están en función de la especie de *Trypanosoma*, la raza y especie del hospedador [4].

Los tripanosomas vivos o muertos producen numerosas sustancias con actividad biológica como neuraminidasas, proteasas y lipasas que lesionan las células endoteliales, células blancas y rojas conduciendo a la remoción posterior de estas últimas en el bazo [5].

Los mecanismos celulares implicados en el proceso infeccioso no se conocen con exactitud, y deben involucrar a los glicoconjugados de membrana entre otros componentes de las membranas celulares del parásito y del hospedador. En este sentido, las lectinas se han convertido a partir de la década de los años 70 en instrumentos importantes en la investigación celular, utilizándose como sondas que permiten evaluar las propiedades de los componentes de las membranas celulares [6].

El uso de ciertas lectinas en la identificación funcional del riñón, resulta favorable por la unión de estas a la membrana luminal de las células intercalares de la corteza y de los túbulos contorneados proximales, sugiriendo posibles aplicaciones en estudios fisiológicos, bioquímicos y morfológicos [7]. Estas moléculas (WGA y RCA) son particularmente afines al túbulo contorneado proximal, membrana basal, matriz mesangial, células mesangiales (epiteliales y endoteliales), mácula densa y células intercalares [8]. Otras lectinas como sCon A, PNA, SBA, UEA-I y MAL-II, han sido utilizadas para determinar cambios composicionales de los glicoconjugados durante el desarrollo y diferenciación celular del riñón de ratón [8]. El propósito del presente trabajo fue determinar las alteraciones en el patrón de enlazamiento de ocho lectinas, en el riñón de ratones infectados experimentalmente con una cepa venezolana de *T. evansi*.

MATERIALES Y METODOS

Lectinas

Las lectinas utilizadas en este estudio fueron las mostradas en la TABLA I.

Parásitos e infección experimental

En el estudio se utilizó una línea de *T. evansi* (Ec/Rn/Frío/1991) derivada de un aislado obtenido en el año 1991 en el hato "El Frío" (Edo. Apure), a partir de un caballo con síntomas de derrengadera. La sangre procedente del equino infectado fue inoculada a ratas de experimentación (Sprague-Dawley), y alícuotas de la sangre de éstas se criopreservaron a -196°C utilizando dimetilsulfóxido (DMSO) al 5% como agente crioprotector.

Para la infección experimental, la sangre infectada y criopreservada fue descongelada y 0,5 mL inoculadas intraperitonealmente (i.p) en ratas Sprague-Dawley, para expandir la población parasitaria. Cuando la parasitemia en las ratas alcanzó valores de 10^9 tripanosomas/mL, se anestesiaron y se les extrajo sangre por punción cardíaca utilizando heparina o ácido etileno-diaminotetraacético (EDTA) como anticoagulantes. La sangre se diluyó en buffer fosfato salino glucosado (FSG), para poder realizar un inóculo vía i.p de 500 tripanosomas/g de peso corporal (10^4 tripanosomas/ratón a cuatro ratones albinos NMRI-IVIC machos de 20 gramos de peso corporal).

Los ratones fueron sacrificados (dos controles y cuatro infectados), cuando la parasitemia de los ratones infectados alcanzó valores de 10^9 tripanosomas/mL.

Técnica histológica

A los ratones sometidos a estudio se les extrajo bajo anestesia los riñones. Los órganos se seccionaron en cuatro piezas que fueron fijadas en fijador B-5 por ocho horas. El exceso de fijador se eliminó por lavado con recambio constante durante 10-12 horas en agua corriente y las piezas deshidratadas en una batería de Etanol (50%, 70%, 80%, 90%, 96% y 100%), infiltrados con tolueno en el siguiente orden: n-Butanol-Etanol (1:1), n-Butanol, n-Butanol-Paraplast (1:1) e incluidos en Paraplast. Posteriormente se obtuvieron cortes histológicos de siete μ m de grosor que se recogieron en portaobjetos recubiertos con poli-L-lisina al 1% (v/v). Los cortes se desparafinaron con Xileno e hidrataron secuencialmente en una batería de etanol de concentración decreciente (100%, 96%, 90%, 80%, 70%, 50% y agua destilada).

Histoquímica de Lectinas

Para la histoquímica de lectinas sobre las secciones de riñón de los animales sanos e infectados con *T. evansi*, se utilizó una batería de ocho lectinas biotiniladas (TABLA I) a una concentración final de 10 mg/mL, en tampón Tris-HCl 0,05 M, pH 7,8 conteniendo 150 mM de cloruro de sodio, 100 mM de cloruro de

TABLA I
LECTINAS BIOTINILADAS UTILIZADAS EN EL TRABAJO [7]

Especie originaria	Acrónimo	Residuo sacárido inhibidor
<i>Canavalia ensiformis</i>	(sConA)	Metil Man > D-Man > D-Glc
<i>Triticum vulgare</i>	(sWGA)	GlcNAc β (1-4)GlcNAc β (1-4)GlcNAc
<i>Glycine max</i>	(SBA)	α - y - β GalNAc terminal >> Gal
<i>Ulex europaeus</i> I	(UEA-I)	Fuc α (1-2)Gal β (1-4)GlcNAc>Fuc-
<i>Sambucus nigra</i>	(SNA)	Neu5Ac- α (2-6)Gal y Neu5Ac- α (2-6)GalNAc
<i>Arachis hypogaea</i>	(PNA)	Gal(β -1,3)GalNAc
<i>Limax flavus</i>	(LFA)	Neu5Ac y Neu5Gc terminal
<i>Maackia amurensis</i>	(MAL-II)	Neu5Ac- α (2-3)Gal β

calcio y 100 mM de cloruro de magnesio, las reacciones lectinas-glicoconjugados se revelaron por el método del Complejo Avidina-Biotina (ABC) según las modificaciones descritas por González y Cánepa [9]. Las secciones se montaron con entelán, se observaron y fotografiaron en un microscopio óptico.

Como control de la especificidad de las reacciones de las lectinas se incluyeron en los ensayos cortes de intestino de rata, órgano para el cual se conoce el patrón de enlazamiento de las lectinas utilizadas. Todas las reacciones se realizaron por duplicado.

Evaluación de los resultados

Las diferencias en el patrón de enlazamiento de las lectinas entre animales sanos e infectados con *T. evansi* se evaluó de manera cualitativa utilizando una escala de apreciación como función de la intensidad del marcaje [9] (TABLA II).

RESULTADOS

Todos los animales infectados con *T. evansi* mostraron signos clínicos típicos de la tripanosomosis animal, tales como: emaciación, mucosas pálidas, pelo erizado y sin brillo, disnea, disminución del hematocrito y postración. La anatomopatología arrojó como resultados esplenomegalia con bazo de color marrón oscuro, hígado rosado de aspecto granuloso, masa muscular disminuida y riñones anémicos con poca grasa.

En el glomérulo renal de los animales sanos e infectados se observó una reacción intensa con la lectina SNA (FIGS. 1 y 2) y en el asa de Henle (FIG. 4 y TABLA III) respectivamente. En los animales infectados se observó un incremento en la afinidad de esta lectina por los túbulos contorneados distales y la matriz extracelular (FIGS. 2 y 3). Con la lectina LFA y en el riñón de los animales infectados se produce un marcaje intenso de los túbulos contorneados distales (FIG. 5) y del endotelio glomerular mientras que los eritrocitos y la matriz extracelular exhiben un marcaje mínimo y moderado respectivamente (TABLA III). También se observó una reacción intensa, tanto en los animales sanos como en los infectados, con la lectina

TABLA II
ESCALA DE EVALUACION CUALITATIVA DEL MARCAJE DE TEJIDOS CON LECTINAS

Intensidad del marcaje	Ponderación
Ausente	-
Mínimo	+
Moderado	++
Intenso	+++

MAL-II en el endotelio glomerular, eritrocitos y matriz extracelular (FIGS. 6 y 7, TABLA III).

Fue notable el incremento en la reacción con la lectina SBA en los túbulos contorneados proximales y distales de los animales infectados en relación a los animales sanos (TABLA III).

En el endotelio glomerular de los animales sanos no se produce marcaje con las lectinas sConA, sWGA, PNA y SBA mientras que en los animales infectados se observó una reacción mínima con sCon A (FIG. 11), PNA (FIG. 12), SBA (FIG. 13) y sWGA (TABLA III), no estableciéndose diferencias entre controles e infectados para el marcaje con la lectina UEA-I (FIG. 14). El marcaje con sWGA de los túbulos contorneados distales (FIG. 10) y del asa de Henle (TABLA III) fue intenso en los animales sanos e infectados.

La cápsula de Bowman de los animales sanos e infectados no mostró marcaje con la lectina PNA, mientras que con la lectina SBA se produjo un aumento moderado del marcaje en los animales infectados. En cuanto a la lectina sWGA se produjo una disminución en la intensidad del marcaje de la cápsula de Bowman como consecuencia de la infección. La lectina SNA revela la presencia de cambios de moderados a intensos en la matriz extracelular, cápsula de Bowman, y el glicocalix de las células de los túbulos contorneados proximales, túbulos contorneados distales y eritrocitos, como consecuencia de la infección con *T. evansi*. En todos los casos se produce un incremento del marcaje de mínimo o ausente en los animales sanos a moderado e intenso en los animales parasita-

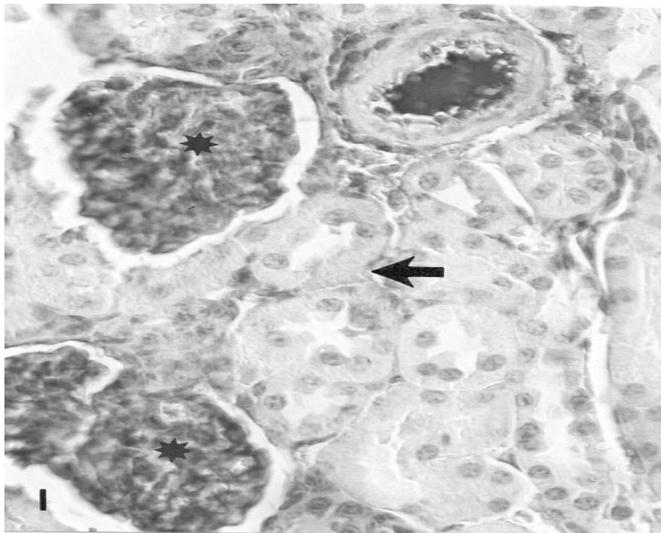


FIGURA 1. TINCIÓN DE CARBOHIDRATOS DE LA CORTEZA RENAL CON LA LECTINA SNA EN GLOMÉRULOS (ASTERISCO), ERITROCITOS (★) Y TÚBULOS CONTORNEADOS DÍSTALES (TCD) (FLECHA) DEL RIÑÓN DE LOS ANIMALES SANOS X 400.

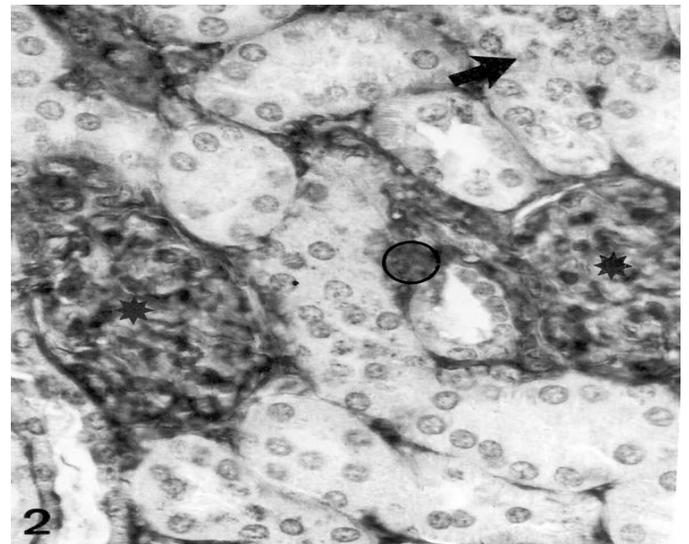


FIGURA 2. MARCAJE CON LA LECTINA SNA EN GLOMÉRULOS (ASTERISCO) Y TÚBULOS CONTORNEADOS DÍSTALES (TCD) (FLECHA) Y MATRIZ EXTRACELULAR (CIRCULO VACÍO) DEL RIÑÓN DE LOS ANIMALES INFECTADOS X 400.

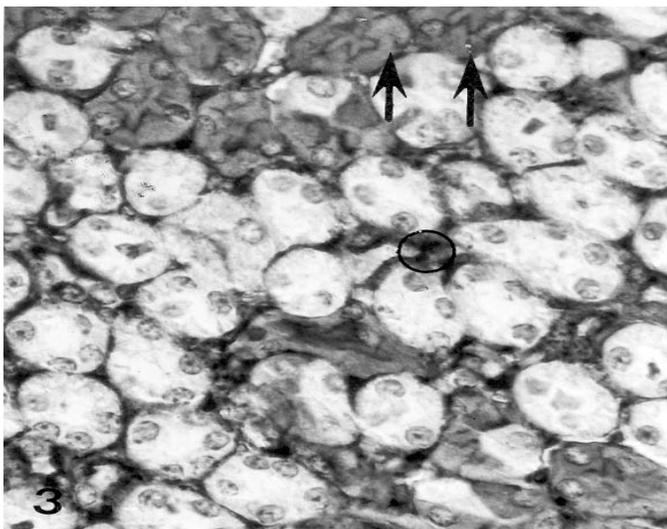


FIGURA 3. TINCIÓN DE CARBOHIDRATOS DE LA CORTEZA RENAL CON LA LECTINA SNA EN LOS TÚBULOS CONTORNEADOS DÍSTALES (TCD) (FLECHA) Y MATRIZ EXTRACELULAR (CIRCULO VACÍO) DEL RIÑÓN DE LOS RATONES INFECTADOS CON *T. evansi* X 400.

dos. No se observó diferencia en el marcaje intenso en controles e infectados con la lectina SNA en el endotelio glomerular, asa de Henle y cápsula renal (TABLA III).

DISCUSIÓN

La sintomatología mostrada por los ratones infectados experimentalmente con *T. evansi*, concuerda con la descrita para los tripanosomas del grupo *brucei*. La hepato-esplenomegalia es típica no sólo de la tripanosomosis animal sino

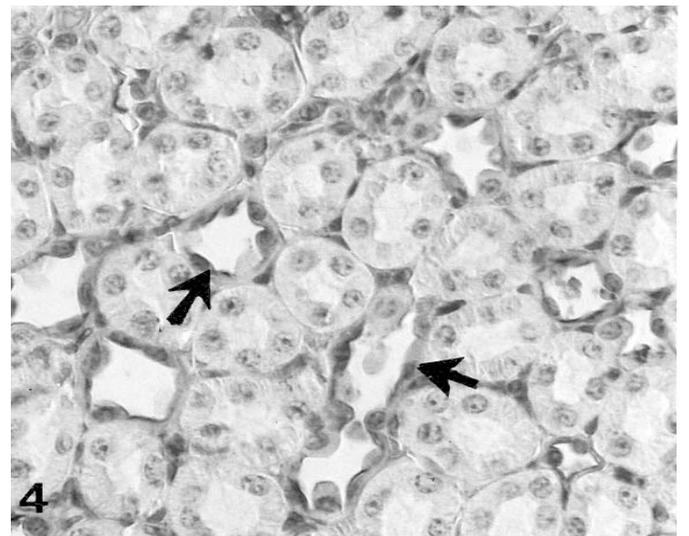


FIGURA 4. MARCAJE CON LA LECTINA SNA EN EL ASA DE HENLE (FLECHA) DEL RIÑÓN DE LOS ANIMALES SANOS X 400.

también de la tripanosomosis humana de tipo africano [10,11] y se asocia con la colonización de estos órganos por los flagelados debido a su gran irrigación sanguínea y la proliferación de células de Kúpffer y macrófagos. Estos dos eventos, aunados a la reacción inflamatoria y al daño celular producido, comprometen progresivamente las funciones de estos y otros órganos, y determina la muerte del hospedador.

En cuanto a la histopatología [12, 13], y la patología ultraestructural [14, 15] de las infecciones causadas por el *T. evansi*, la misma ha sido ampliamente estudiada en acures (conejiillos de India), ratones y ratas. Sin embargo, no existen

TABLA III
RESULTADOS DEL MARCAJE DEL RIÑÓN DE RATONES SANOS E INFECTADOS CON *T. evansi*

Lectinas	sCon A		sWGA		PNA		SBA		UEA-I		LFA		SNA		MAL-II	
	S	I	S	I	S	I	S	I	S	I	S	I	S	I	S	I
Riñón Tejidos	S	I	S	I	S	I	S	I	S	I	S	I	S	I	S	I
Endotelio Glomérulo	-	+	-	+	-	+	-	+	+	+	++	+++	+++	+++	+++	+++
Cápsula Bowmann	++	++	++	-	-	-	-	++	-	-	+	+	-	++	-	+
T. C. P.	++	+	++	++	-	+	-	+++	+	+	-	-	-	+++	-	+
T. C. D.	++	+	+++	+++	-	+	-	+++	+	+	++	+++	+	+++	+	+
Eritocitos	++	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+++	+++	+++
Matriz Ex- tracelular	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+++	+	++	+	++	++	+++
Asa de Henle	-	-	+++	+++	-	++	++	++	-	-	++	++	+++	+++	++	-

LEYENDAS:

S: Sano
I: Infectado
T.C.P: Túbulo Contorneado Proximal.
T.C.D: Túbulo Contorneado Distal.

- Ausente
+ Mínimo
++ Moderado
+++ Intenso
— No se observó la zona del tejido.

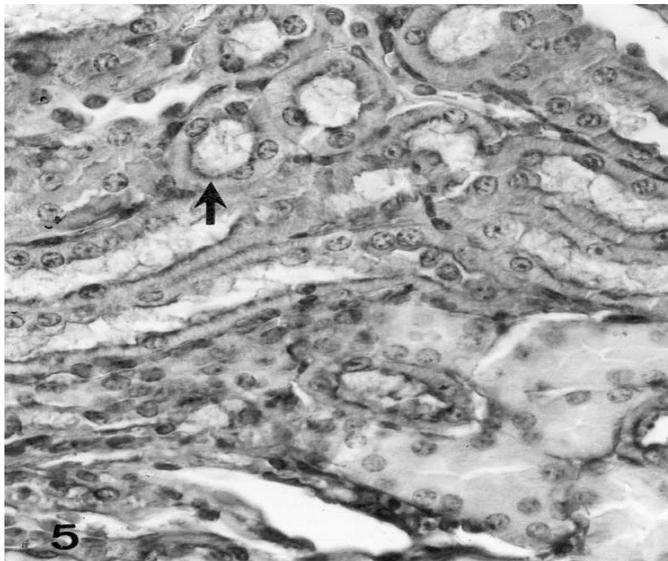


FIGURA 5. TINCIÓN DE CARBOHIDRATOS DE LA CORTEZA RENAL CON LA LECTINA LFA EN LOS TÚBULOS CONTORNEADOS DÍSTALES (TCD) (FLECHA) EN EL RIÑÓN DE LOS RATONES INFECTADOS CON *T. evansi* X 400.

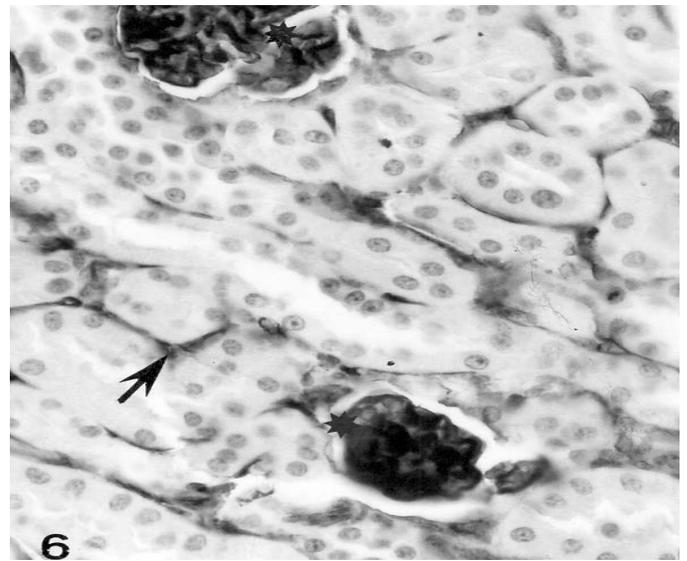


FIGURA 6. CONTRASTACIÓN INTENSA CON LA LECTINA MAL-II EN LOS GLOMÉRULOS (ASTERISCO), MATRIZ EXTRACELULAR (FLECHA) DE LAS SECCIONES DE RIÑONES DE LOS RATONES SANOS X 400.

trabajos sobre la histoquímica de lectinas en las infecciones causadas por este parásito.

En este sentido, los residuos de ácido siálico presentes en posición terminal en las glucoproteínas y gangliósidos están implicados en muchos aspectos del crecimiento y desarrollo normal y patológico. Estos azúcares juegan un papel importante regulando los procesos de reconocimiento celular y molecular, dado que en muchas situaciones son componentes esenciales de receptores implicados en la transducción de señales, funcionando como enmascadores biológicos que por efectos estéricos y/o repulsión electrostática, son capaces de prevenir o reducir la accesibilidad de los ligandos a sus receptores sobre la superficie celular. Adicionalmente los diferentes

tipos de ácidos siálicos son importantes en la carga neta de superficie celular de los mamíferos y protistas parásitos; siendo relativamente abundantes en el glucocalix de distintos tipos celulares de mamífero tales como enterocitos, eritrocitos y células caliciformes maduras en el intestino delgado [16].

Los resultados obtenidos con las lectinas que reconocen residuos de ácido siálico, contrastan con los de otros investigadores sobre la disminución de la proporción de ácido siálico en los eritrocitos de bovinos infectados con *T. vivax* [17] y en la lisis de glóbulos rojos y neuronas mediada por sialidasas de *T. evansi* [18]. En este sentido, se evidenció un incremento moderado e intenso de la reactividad de las lectinas LFA y SNA, respectivamente, hacia los eritrocitos de los animales in-

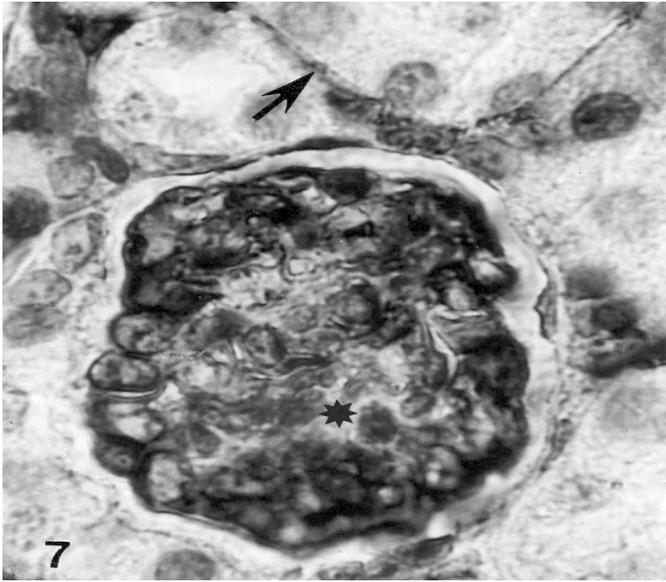


FIGURA 7. CONTRASTACIÓN INTENSA CON LA LECTINA MAL-II EN LOS GLOMÉRULOS (ASTERISCO), MATRIZ EXTRACELULAR (FLECHA) Y ERITROCITOS (CABEZA DE FLECHA) DEL RIÑÓN DE RATONES INFECTADOS CON *T. evansi* X 1000.

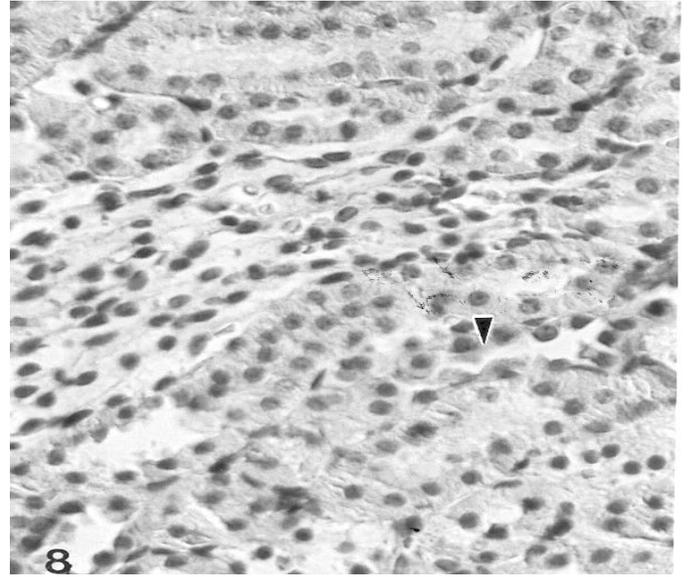


FIGURA 8. FOTOMICROGRAFÍA DE UNA SECCIÓN DEL RIÑÓN DE RATONES CONTROLES INCUBADA CON LA LECTINA LFA, EN ELLA SE PUEDE APRECIAR UNA TINCIÓN MODERADA EN EL ASA DE HENLE (CABEZA DE FLECHA) X 100.

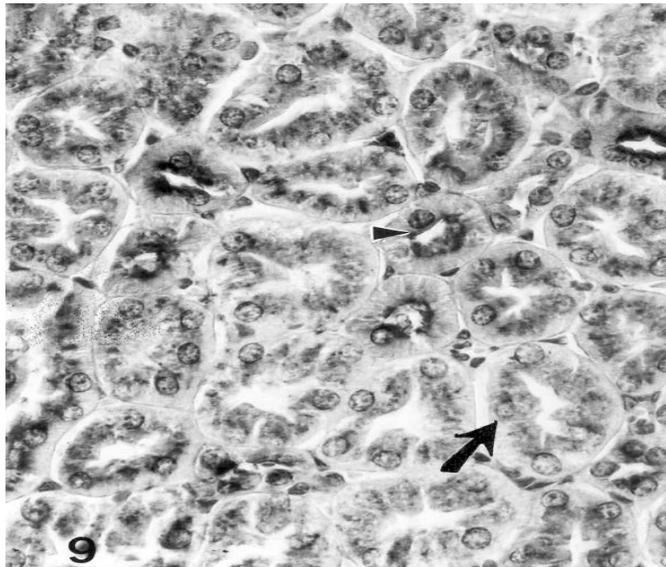


FIGURA 9. FOTOMICROGRAFÍA DE UNA SECCIÓN DEL RIÑÓN DE RATONES INFECTADOS CON *T. evansi*, INCUBADA CON LA LECTINA LFA. EN ELLA SE OBSERVA UNA FUERTE TINCIÓN DE LOS TÚBULOS CONTORNEADOS DÍSTALES (FLECHA) Y PROXIMALES (CABEZA DE FLECHA) X 400.

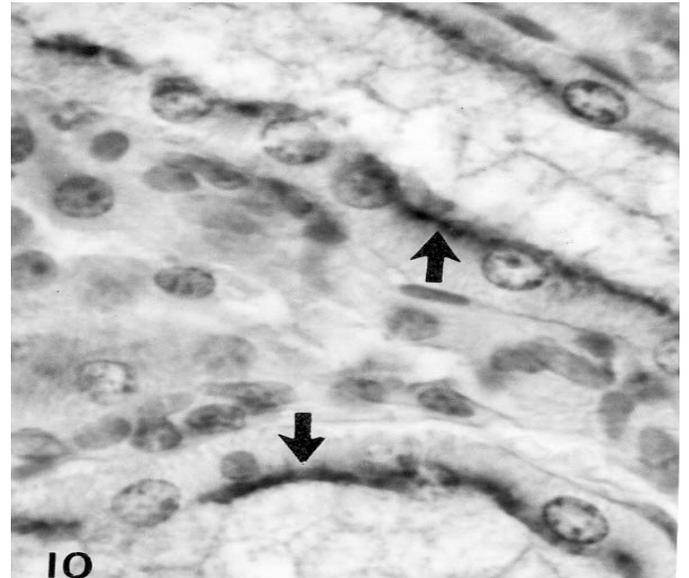


FIGURA 10. FOTOMICROGRAFÍA DE UNA SECCIÓN LONGITUDINAL DEL RIÑÓN DE RATÓN INFECTADO CON *T. evansi* E INCUBADA CON LA LECTINA sWGA, EN LA QUE SE OBSERVA UNA TINCIÓN INTENSA DE LOS TÚBULOS CONTORNEADOS DÍSTALES (TCD) X 1000.

fectados con *T. evansi*. Adicionalmente, en este estudio se comprobó que el incremento en la intensidad del marcaje con lectinas que reconocen ácidos siálicos en el riñón de los animales infectados con *T. evansi* se extiende a la cápsula de Bowman (de ausente a mínimo con MAL-II y de ausente a moderado con SNA), al endotelio glomerular (de moderado a intenso con LFA, a la matriz extracelular (de mínimo a moderado

con LFA y SNA, y de moderado a intenso con MAL-II, a los túbulos contorneados proximales (de ausente a intenso con SNA y de ausente a mínimo con MAL-II y a los túbulos contorneados distales (de mínimo a intenso con SNA).

Estos resultados podrían interpretarse en función de la probable ausencia de actividad neuraminidasa en *T. evansi* a diferencia de *T. vivax* [17], sumada a la incidencia de tres fe-

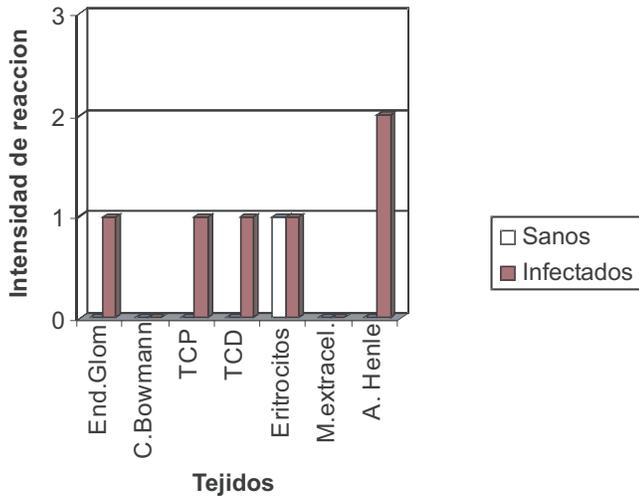


FIGURA 11. PATRÓN DE ENLAZAMIENTO DE LA LECTINA sCON A EN EL RIÑÓN DE RATONES INFECTADOS CON *T. evansi*.

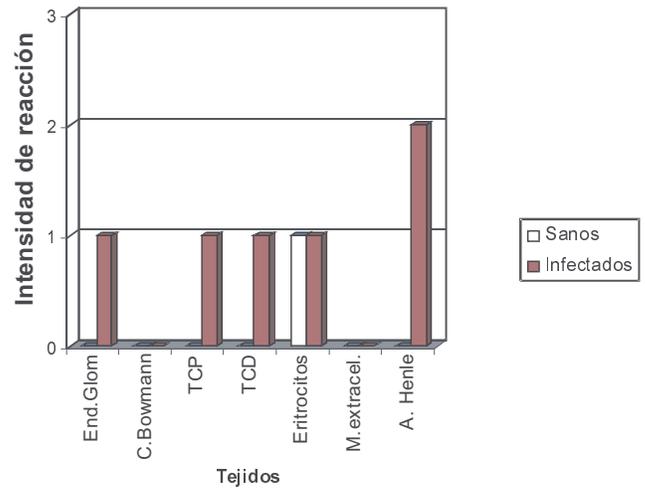


FIGURA 12. PATRÓN DE ENLAZAMIENTO DE LA LECTINA PNA EN EL RIÑÓN DE RATONES INFECTADOS CON *T. evansi*.

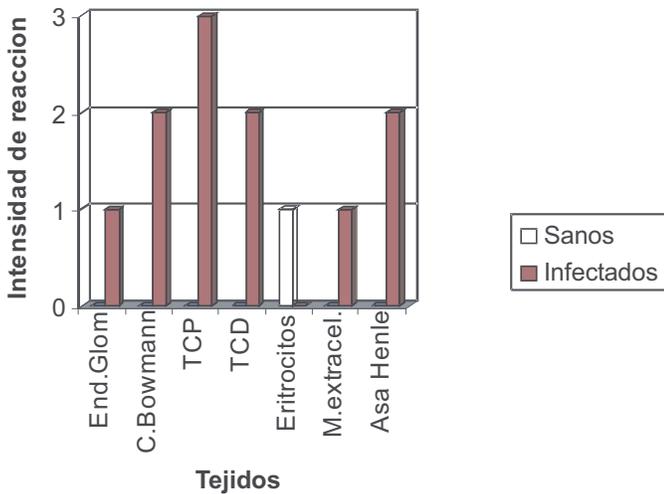


FIGURA 13. PATRÓN DE ENLAZAMIENTO DE LA LECTINA SBA EN EL RIÑÓN DE RATONES INFECTADOS CON *T. evansi*.

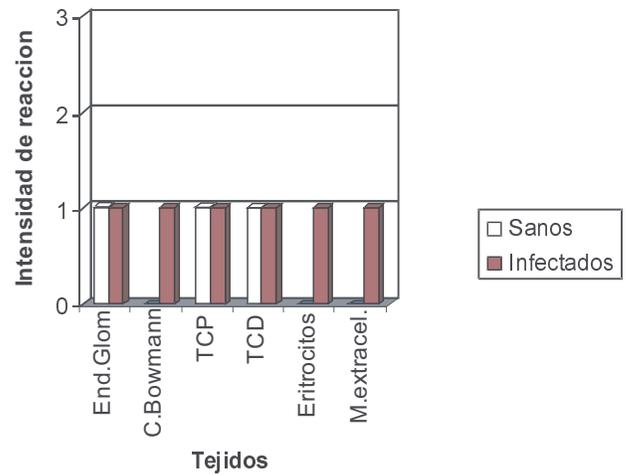


FIGURA 14. PATRÓN DE ENLAZAMIENTO DE LA LECTINA UEA-I EN EL RIÑÓN DE RATONES INFECTADOS CON *T. evansi*.

nómenos: I) un incremento de sialidización de los eritrocitos y matriz extracelular a expensas de glicoconjugados de origen tripanosómico que se liberan a partir de los tripomastigotes hematozoicos muertos o que son secretados por los parásitos viables, II) la ocurrencia del fenómeno de adhesión con fusión de las membranas eritrocitarias y tripanosómicas [19, 20] y III) un incremento en la interacción de estas lectinas a la superficie de las células, mediado por fuerzas hidrofóbicas que se establecen entre las lectinas y los complejos inmunológicos circulantes adsorbidos a la superficie y IV) la presencia de transialidasas en *T. evansi*. Estas moléculas ya han sido detectadas en *T. brucei* y *T. cruzi* [21].

La primera hipótesis es sostenida por el hecho que durante la tripanosomosis de tipo africana, los parásitos pueden causar daños a las células de su hospedador de manera indirecta gracias a la secreción o liberación de macromoléculas

que tienen como blanco las membranas de la célula hospedadora [5]. Estas macromoléculas pueden tener actividad biológica sobre los componentes de la superficie de la célula hospedadora, ser de naturaleza glicoproteica y contener ácidos siálicos con relativa abundancia.

En la tripanosomiasis la ocurrencia del fenómeno de adhesión del *T. congolense* a eritrocitos y células endoteliales es mediado por estructuras filamentosas emitidas por los tripomastigotes hematozoicos que establecen contactos con la superficie de la célula hospedadora. Estos filamentos han demostrado por ultracitoquímica de lectinas conjugadas a oro coloidal contener residuos de ácido siálico [22] y en los epimastigotes de *T. congolense* se corresponden con la expresión de una glucoproteína de 70 kD [23]. Este fenómeno de adhesión también ha sido descrito para el *T. brucei* con eritrocitos y plaquetas [19] y para el *T. evansi* con eritrocitos [20]. Anosa y Kaneko [19] señalan que el incremento en la fagocitosis hepática es una consecuencia del

fenómeno de adhesión y de la incidencia de mecanismos que alteran la superficie del glóbulo rojo, modificándola antigénica y bioquímicamente por la adsorción de complejos inmunológicos y remoción de los residuos de ácido siálico.

En el último caso la evidencia morfológica y ultraestructural parece indicar, que el fenómeno ocurre no sólo con la emisión de un material tripanosómico filamentosos sino también por la fusión de membranas con formación de vesículas. Esta fusión de membranas podría determinar una modificación del glucocalix del eritrocito, enriqueciéndolo en glicoconjugados con ácido siálico procedentes de la membrana del parásito, y a su vez marcándolos para su remoción posterior en el bazo e hígado. Adicionalmente, el incremento en el marcaje con lectinas que reconocen ácido siálico podría atribuirse a la actividad de unas transialidasas recientemente descritas en tripanosomas (*T. brucei* y *T. cruzi*). Se ha sugerido que éstas enzimas no sólo son capaces de sialilar la superficie de los tripanosomas procíclicos, sino también la de los eritrocitos desialilados y otras células [21, 24] Esta enzima tiene la capacidad de transferir reversiblemente los residuos de ácido siálico $\alpha(23)$ enlazados a un residuo de galactosa externa (Gal β) sobre la superficie de los tripanosomas, a cualquier glucoconjugado en la superficie de la célula hospedadora que posea una galactosa externa (Gal β) [21].

En el contexto de la infección experimental con *T. evansi*, es probable que dado el gran número de parásitos circulantes, se produzca una respuesta inmunológica que conduce a la destrucción de una fracción considerable de tripanosomas. La lisis de los parásitos tiene como consecuencias la liberación de macromoléculas complejas procedentes del cuerpo de los mismos, que se adhieren hidrofóticamente a las membranas y pueden interactuar de la misma forma con las lectinas durante el proceso infeccioso.

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos inducen a pensar que tanto los tripanosomas vivos o muertos, así como las sustancias biológicamente activas liberadas por ellos, son capaces de alterar la composición de ciertos glucoconjugados en las células del riñón de ratón. Este efecto puede manifestarse con una disminución en el patrón de enlazamiento de ciertas lectinas como ocurre con sConA en los túbulos contorneados proximales, distales y eritrocitos; un aumento como ocurre con SNA en cápsula de Bowman, túbulo contorneado proximal, distal, eritrocitos y matriz extracelular, o no inducir ningún cambio, como es el caso de MAL-II en los eritrocitos. En este estudio no se descarta la posible secreción de glucosidasas capaces de remover azúcares específicos a partir de los glicoconjugados de membrana.

Los resultados de la aplicación histoquímica de lectinas plantean la posibilidad de implementar la técnica para el estudio de las variaciones que se producen en los patrones de enlazamiento de las lectinas con fines de diagnóstico histopatológico en la tripanosomosis animal.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] HORCHNER, F.; AHMED, J.S.; GEILER, B. Antigenic Variation of *Trypanosoma evansi* in Rabbits. **Trop med Parasit.** 35: 242-246. 1984.
- [2] SOUSLBY, E.J. **Parasitología y Enfermedades Parasitarias en los Animales Domésticos.** 7a-Ed. Nueva Editorial Interamericana S. A. México, D.F. 823 pp. 1987.
- [3] RAYMOND, H.L. *Tabanus importunus*, experimental mechanical vector of *Trypanosoma vivax* in French Guiana. **Ann. Parasitol. Hum. Comp.** 65 (1): 44-46. 1990.
- [4] LOSOS, G.J.; IKEDE, B.O. Review of Pathology of the Diseases in Domestic and Laboratory Animals Caused by *Trypanosoma congolense*, *T. vivax*, *T. brucei*, *T. rhodesiense* and *T. gambiense*. **Vet Pathol.** 9: 1-71. 1972.
- [5] IGBOKWE, I.O. Mechanisms of Cellular Injury in African Trypanosomiasis. **Vet Bull.** 64: 611-620. 1994.
- [6] LIENER, I.; SHARON, N.; GOLDSTEIN, I. **The Lectins: Properties, Functions, and Applications in Biology and Medicine.** Academic Press, Inc. Florida. USA. 553 pp. 1986
- [7] HANAI, T.; USUDA, N.; MORITA, T.; NAGATA, T. Light Microscopic Lectin Histochemistry in Aging Mouse Kidney: Study of Compositional Changes in Glycoconjugates. **J Histochem Cytochem** 42 (7): 897-906. 1994.
- [8] BRETTON, R.; BARIETY, J. A Comparative Ultrastructural Localization of Concanavalin A, WGA and RCA in the Glomeruli of Normal Rat Kidney. **J Hist Cytochem** 24: 1093. 1976.
- [9] GONZÁLEZ-ELORRIAGA, M.; CÁNEPA, G. Los mastocitos en la lengua del sapo *Bufo marinus* L. caracterización histoquímica de glucoconjugados con técnicas convencionales y con lectinas. **Acta Cient. Venez.** 53: 183-194. 2002.
- [10] POLTERA, A.A. Pathology of human African trypanosomiasis with reference to experimental African trypanosomiasis and infections of the central nervous system. **Brit Med Bull.** 41: 169-174. 1985.
- [11] RIVERA, M.A. **Hemoparasitosis Bovinas.** Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico, Universidad Central de Venezuela, Anaco Ediciones C.A. Caracas, Venezuela. 222 pp. 1996.
- [12] SARMAH, P.C.; BHATTACHARYULU, Y.; GUPTA, P.P. Experimental *Trypanosoma evansi* (Steel, 1885) Balbiani, 1888 in mice and guinea pigs. **Acta Vet.** 35: 333-340. 1985.

- [13] BISWAS, D.; CHOUDHURY, A.; MISRA, K.K. Histopathology of *Trypanosoma (Trypanozoon) evansi* Infection in Bandicoot Rat. I. Visceral Organs. **Exp Parasitol**, 99: 148-159. 2001.
- [14] ROSSI, M.; BOADA-SUCRE, A.; FINOL, H.J.; TEJERO, F.; ASO, P.; BELLO, B.; HERNÁNDEZ, G. Ultrastructural alterations in the adrenal gland cortex of mice experimentally infected with a Venezuelan isolate of *Trypanosoma evansi*. **J Submicrosc Cytol Pathol**. 31: 509-513. 1999.
- [15] FINOL, H.J.; BOADA-SUCRE, A.; ROSSI, M.; TEJERO, F. Skeletal muscle ultrastructural pathology in mice infected with *Trypanosoma evansi*. **J Submicrosc Cytol Pathol**. 33: 65-71. 2001.
- [16] KING, T.P. **Lectin Cytochemistry and Intestinal Epithelial Cell Biology** (Chapter 10). In *Lectins: Biomedical Perspectives*. Ed. By Pusztai, A. & Barducz, Taylor and Francis. 183-210 pp. 1995.
- [17] ESIEVO, K.A.N.; SAROR, D.I.; ILEMOBADE, A.A.; HAL-LAWAY, M.H. Variation in Erythrocyte Surface and Free Serum Sialic Acid Concentrations During Experimental *Trypanosoma vivax* infection in Cattle. **Res in Vet Scie** 2: 1-5. 1982.
- [18] NOK, A.J.; HUMPREY, C.; ZELIBE, N.; YAKO, S.K. Sialidase: surface localization, properties and hydrolysis of ghost red blood cells and brain cells-identification in tripanosomiasis. **Zentrabl Natur**. 58: 504-601. 2003.
- [19] ANOSA, V.O.; KANEKO, J.J. Pathogenesis of *Trypanosoma brucei* infection in deer mice (*Peromyscus maniculatus*): Light and Electron Microscopic Studies on Erythrocyte Pathologic Changes and Phagocytosis. **Am J of Vet Res** 44: 645-651. 1983.
- [20] ROSSI S., M.S.; BOADA-SUCRE, A.A.; RODRÍGUEZ, P.; DE STEFANO, H.; BOHER, Y.; FINOL, H.J.; APONTE, Y.; BELLO, B.. Microscopía electrónica de barrido y transmisión de la adhesión "in vivo" del *Trypanosoma evansi* a los eritrocitos murinos. IX Congreso Venezolano de Microscopía Electrónica, Cumaná. **Acta Microsc**. Supl. 1. 74-75 pp. 2000.
- [21] COLLI, W. Trans-sialidase: a unique enzyme activity discovered in the protozoan *Trypanosoma cruzi*. **Faseb J**. 7: 1257-1264. 1993.
- [22] HEMPHIL, A.; ROSS, C.A. Flagellum-mediated adhesion of *Trypanosoma congolense* to bovine aorta endothelial cells. **Parasitol Res**. 81:412-420. 1995.
- [23] BEATTIE, P.; GULL, K. Cytoskeletal architecture and components involved in the attachment of *Trypanosoma congolense* epimastigotes. **Parasitol** 117: 47-55. 1997.
- [24] ENGSTLER, M.; SCHAUER, R. Sialidases from african trypanosomes. **Parasitol Today**. 9: 222-225. 1993.