

97  
2ej.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

CARACTERIZACION BIOLOGICA "IN VITRO" DE  
17 CEPAS MEXICANAS DE Trypanosoma cruzi.

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

**B I O L O G O**

P R E S E N T A :

**MARIA VICTORIA LOPEZ OLMOS**



MEXICO, D. F.



1994



## **UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso**

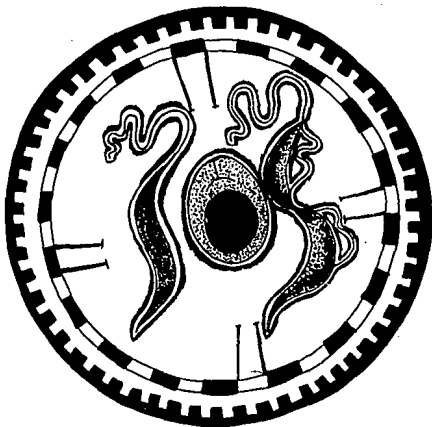
### **DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO  
FACULTAD DE CIENCIAS

CARACTERIZACION BIOLÓGICA "IN VITRO" DE 17 CEPAS  
MEXICANAS DE *Trypanosoma cruzi*.



MARIA VICTORIA LOPEZ OLMOS

**Esta investigación fue realizada bajo la asesoría de la Dra. Bertha Espinoza en el Departamento de Inmunología del Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México.**

**Agradezco a la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA, UNAM), por haberme otorgado una beca para la elaboración del presente trabajo. La investigación formó parte del proyecto: "Caracterización Molecular de Aislados Mexicanos de Trypanosoma cruzi". Clave IN 205692.**

## **DEDICATORIA.**

**A FROYLAN, mi amigo y hermano  
por su gran apoyo y estímulo en  
mi superación académica.**

**A mis padres: Alejandra y Ausencio  
por su infinito amor.**

**A mis hermanos: Lupita, Tina, Elo  
y Jaime, por su presencia.**

## AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la Dra. Bertha Espinoza Gutiérrez por sus enseñanzas para mi formación en la Investigación.

Agradezco a mi Comité de Sinodales formado por la Dra. Bertha Espinoza, Dra. Ma. Antonieta Aladro, M en C. Rosaura Mayén, Dr. Guillermo Salgado y al Q.F.B. Fernando Ramos, por la revisión del presente trabajo.

Agradezco a la Bióloga Norma Espinoza, por su asesoramiento en el cultivo de I. cruzi, y a la pasante de Q.F.B. Claudia Garay, por su asesoramiento en el cultivo de las líneas celulares empleadas en este trabajo.

Agradezco a los M.V.Z. Gerardo Arrellín y José Juan Carreño por asesorarme en el manejo de animales de laboratorio. También agradezco al fotógrafo, Sr. José Aviléz por su ayuda en la elaboración de material de ilustración.

Agradezco a los pasantes de biólogos, Hildelberto Ordaz y Alfredo Ayala por su desinteresada ayuda.

Agradezco a la pasante de biólogo Lourdes Caballero por la elaboración del dibujo que aparece en la portada.

Agradezco a mis compañeros y amigos de laboratorio, Norma Isabel, Ernesto, Alejandro, Angélica, Rocío, Claudia, Verónica, Alfredo y Salvador por formar un ambiente de trabajo agradable; también agradezco a mis vecinos de laboratorio, Enrique, Isabel, Gino, Carla y Martha, por los mismos motivos.

## INDICE.

	Páginas.
<b>RESUMEN</b>	<b>1</b>
<b>I. INTRODUCCION</b>	<b>3</b>
1.1. Países Endémicos de la Enfermedad de Chagas	5
1.2. Enfermedad de Chagas en México	7
1.3. Biología de <u>T. cruzi</u>	12
1.3.1. Posición taxonómica	12
1.3.2. Morfología	14
1.3.3. Ciclo biológico	16
1.4. Mecanismos de Transmisión	18
1.5. Vectores de <u>T. cruzi</u> en México	19
1.6. Patología	19
1.7. Cultivo de <u>T. cruzi</u> <i>in vitro</i>	21
1.8. Metaciclologénesis	25
1.9. Interacción célula hospedera- <u>T. cruzi</u>	30
1.10. Heterogeneidad en <u>T. cruzi</u>	35

<b>II. OBJETIVOS</b>	<b>37</b>
<b>III. METODOLOGIA</b>	<b>38</b>
<b>III.1. Cultivo Celular</b>	<b>38</b>
<b>III.1.1. Parásitos</b>	<b>38</b>
<b>III.1.2. Líneas celulares</b>	<b>40</b>
<b>III.2. Evaluación del Crecimiento Poblacional de los Parásitos en Cultivo.</b>	<b>41</b>
<b>III.2.1. Conteo de parásitos</b>	<b>41</b>
<b>III.3. Inducción y Evaluación del Proceso de Metacicloogénesis.</b>	<b>43</b>
<b>III.3.1. Inducción de metacicloogénesis</b>	<b>43</b>
<b>III.3.2. Evaluación de metacicloogénesis</b>	<b>43</b>
<b>III.4. Evaluación de la Virulencia por Método Enzimático.</b>	<b>45</b>
<b>III.5. Evaluación de la Infección por Método Microscópico.</b>	<b>46</b>
<b>III.5.1. Preparación de cubreobjetos</b>	<b>46</b>
<b>III.5.2. Infección celular</b>	<b>47</b>
<b>III.5.3. Cuantificación de la infección por <u>T. cruzi</u>.</b>	<b>48</b>
<b>III.6. Análisis Estadístico</b>	<b>49</b>



<b>IV. RESULTADOS</b>	<b>50</b>
<b>IV.1. Crecimiento de <u>I. cruzi</u> en Diferentes Medios de Cultivo.</b>	<b>50</b>
<b>IV.1.1. Diferencias de crecimiento de cepas mexicanas en medio Grace.</b>	<b>52</b>
<b>IV.2. Inducción de Metacicloogénesis en <u>I. cruzi</u>.</b>	<b>57</b>
<b>IV.3. Infectividad de <u>I. cruzi</u> Sobre Células Fagocíticas y no Fagocíticas.</b>	<b>62</b>
<b>IV.4. Virulencia de <u>I. cruzi</u> Sobre Células Fagocíticas y no Fagocíticas.</b>	<b>67</b>
<b>V. DISCUSION</b>	<b>70</b>
<b>VI. CONCLUSIONES</b>	<b>79</b>
<b>VII. BIBLIOGRAFIA</b>	<b>81</b>
<b>APENDICE I</b>	<b>92</b>
<b>APENDICE II</b>	<b>96</b>

## RESUMEN.

Las diferentes cepas de *T. cruzi* que se han estudiado, muestran una gran heterogeneidad entre sí, ya que son distintas en sus propiedades biológicas como son: crecimiento, infectividad, patogenicidad y tropismo celular; también se han observado diferencias en sus patrones isoenzimáticos, contenido de DNA total y digestión del DNA del cinetoplasto por medio de enzimas de restricción. Tal variabilidad y el poco conocimiento de las cepas mexicanas, dio pauta para la realización del presente trabajo, que pretendió realizar la caracterización biológica (crecimiento, metacicloogénesis, infectividad y virulencia) de cepas mexicanas de *T. cruzi*, y compararlas con cepas sudamericanas de referencia. Para la caracterización de crecimiento e inducción de metacicloogénesis, se cultivaron las distintas cepas de *T. cruzi*, en diferentes medios de cultivo: TAUP (Triatomine Artificial Urine), suplementado con 10 mM de L-prolina]; LIT (Liver Infusion Tryptose, suplementado con 25 y 50  $\mu$ g de hemina/ml) y Grace (medio especial para células de insecto). El medio más favorable, para el crecimiento de las cepas de *T. cruzi*, fue el medio LIT con 25  $\mu$ g de hemina/ml, a diferencia del medio TAUP y el medio Grace que fueron pobres sustentadores del crecimiento. En contraste este último medio resultó ser el mejor inductor de metacicloogénesis en los diferentes parásitos, obteniéndose un porcentaje de 15 a 41% de transformación en cepas mexicanas y un porcentaje de

36 a 66% en cepas sudamericanas. Así también, se observaron diferencias en la capacidad de transformación, de las cepas de T. cruzi, de acuerdo a su origen geográfico. Los tripomastigotes obtenidos, por la inducción de metacicloogénesis, se utilizaron para estudiar infectividad y virulencia in vitro para lo cual se co-incubaron con dos líneas celulares, la línea de macrófagos P388 y células epiteliales de la línea Vero. La cepa más infectiva fue la cepa Z10 en células Vero. Finalmente se evaluó el poder infectivo de ocho cepas mexicanas y cuatro cepas sudamericanas, observándose mayor virulencia con las cepas C4, Esmeraldo, H3, H5 y Z21 (60 a 70%) en macrófagos P388. Estos resultados mostraron heterogeneidad en: metacicloogénesis, infectividad y virulencia in vitro en las diferentes cepas mexicanas analizadas, así como diferencias con las cepas sudamericanas usadas como referencia. Los resultados obtenidos en este trabajo permitieron el establecimiento de modelos de infectividad in vitro de cepas mexicanas de T. cruzi a diferentes líneas celulares.

## I. INTRODUCCION.

La enfermedad de Chagas o Tripanosomiasis Americana, es una enfermedad que resulta de la infección por el protozoario flagelado Trypanosoma cruzi. Esta enfermedad fue descrita por primera vez en 1909 por el Dr. Carlos Chagas en su país natal, Brasil; es limitada al Continente Americano, particularmente a los países de América Latina tropical y subtropical (W.H.O, 1986; Salazar y col., 1988). La Tripanosomiasis Americana es transmitida principalmente por un insecto triatómino perteneciente a la familia Reduviidae. Se le ha dado la terminología médica de zoonosis, refiriéndose a infecciones y enfermedades naturalmente transmitidas entre los animales y el hombre. Sin embargo, en 1964, Schwabe realizó una clasificación más completa basándose en el ciclo biológico del agente etiológico de los diferentes grupos, e incluyó a la enfermedad de Chagas dentro de las metazoonosis, que son las zoonosis transmitidas por artrópodos, en donde se presenta un periodo de incubación extrínseca en el invertebrado precediendo a la transmisión del hospedero (citado en Tay y col., 1984).

La enfermedad de Chagas constituye un importante problema de salud pública presentando una distribución muy amplia (Fig. 1). En base a datos publicados de diferentes partes de América Latina, se estima que por lo menos de 15 a 20 millones de personas en áreas rurales y urbanas se encuentran infectadas por



**Fig. 1. DISTRIBUCION GEOGRAFICA DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS.** Se muestran los principales países afectados con T. cruzi (tomado de OPS, 1990).

**T. cruzi** y en riesgo cerca de 90 millones de personas. En Brasil (país que es endémico para esta parasitosis) la incidencia de infección es estimada en 120 mil nuevos casos al año y también se tienen datos de que por cada 10 personas infectadas una muere en un rango de edades que va de entre los 25 a 64 años (W.H.O., 1986; Schenone y Rojas, 1989). **T. cruzi** y su vector están ampliamente distribuidos en América, desde el sur de Estados Unidos (42° latitud Norte) hasta Chile y Argentina (43° latitud Sur) (OPS, 1990; Domínguez, Ricárdez y Espinoza, 1990).

#### **1.1. Países Endémicos de la Enfermedad de Chagas.**

Los países endémicos pueden clasificarse a partir de los siguientes criterios: la magnitud de la transmisión, la cantidad y calidad de la información epidemiológica disponible y la existencia o falta de medidas coordinadas para controlar esta enfermedad. Tomando en cuenta estos criterios los países se han clasificado en 4 grupos (OPS, 1990).

Grupo I. Incluye a Argentina, Brasil, Chile, Ecuador, Paraguay, Perú, Uruguay y Venezuela; caracterizándose por una intensa propagación de la enfermedad que ha obligado a las autoridades de salud a establecer programas de control de estructura vertical o, dentro del marco de las estrategias de atención primaria de salud.

Grupo II. En los países aquí comprendidos se pudo comprobar la transmisión domiciliaria. En Bolivia, Colombia y Costa Rica existe una obvia relación entre la infección por T. cruzi y las anomalías registradas en electrocardiogramas, así como otras patologías atribuibles a la enfermedad de Chagas. Lamentablemente, pese al conocimiento que tienen las autoridades de salud del problema y al interés cada vez mayor por encontrar una solución, todavía no se han iniciado actividades relacionadas con programas de control en esos países. Por otra parte la información sobre la actual situación epidemiológica de México indica una elevada prevalencia de reacciones serológicas positivas contra los antígenos de T. cruzi, además en algunos lugares se han notificado visceromegalias y cardiopatías relacionadas con las infecciones por este parásito. Dados estos hechos, se ha incluido a México en este grupo.

Grupo III. En este grupo se incluyen El Salvador, Guatemala, Honduras, Nicaragua y Panamá, en donde se ha comprobado la transmisión domiciliaria. En todos estos países se observa con frecuencia la fase aguda de la enfermedad de Chagas y los

datos serológicos obtenidos indican que el número de reacciones positivas a los antígenos contra **T. cruzi** es relativamente elevado.

Grupo IV. Aquí se agrupan los países que tienen en común la presencia de reservorios y de insectos triatóminos naturalmente infectados con **T. cruzi**, es decir que la enfermedad es enzoótica. En algunos países [Antigua y Barbuda, Aruba, Las Bahamas, Belice, Cuba, Curazao, los Estados Unidos de América, Grenada, Guadalupe, la Guayana Francesa, Guyana, las islas Vírgenes Británicas, las Islas Vírgenes (Norteamericanas), Jamaica, Martinica, la República Dominicana, San Vicente y las Granadinas, Surinam y Trinidad y Tobago] la presencia de **T. cruzi** se ha encontrado únicamente en triatóminos. Belice y Trinidad y Tobago han notificado algunas infecciones humanas en el pasado y Guyana en 1981, también informó sobre la presencia de casos humanos (OPS, 1990).

## **1.2. Enfermedad de Chagas en México.**

El conocimiento sobre la enfermedad de Chagas en nuestro país no es nuevo, pues sus vectores se conocían desde la época prehispánica y durante la colonia. Así en 1528 Antonio Herrera escribió que el ejército expedicionario fue "víctima molesta de los mosquitos y pitos que pican y dejan señal como chinche y suelen



causar calentura"; Fray Bernardino de Sahagún en su obra "Historia General de las cosas de la Nueva España", señaló la existencia de los triatóminos y los describe así: "hay unas cucarachillas pardillas y traen dos maneras de alas con que vuelan, que son ponzoñosas y donde pican imprimen comezón e hinchazón". En 1891, Latreille, describió a uno de los más importantes transmisores de T. cruzi en México y Centroamérica: Triatoma dimidiata (citado en Velasco-Castrejón y col., 1991). No obstante estos antecedentes, no fue sino hasta 1928 cuando Hoffman inició los estudios sobre triatóminos y sus relaciones con la enfermedad de Chagas; años más tarde Mazzotti (1940) informó por primera vez de la existencia de dos casos humanos, de enfermedad de Chagas en la población de Teojomulco, estado de Oaxaca. Palomo y Rubio reportaron el tercer caso de tripanosomiasis, en Mérida, Yucatán (citado en Mazzotti y Dias, 1949). En 1946, Aguirre señaló la presencia de T. cruzi, en mamíferos (tlacuaches) y reduvidos (Triatomas), pertenecientes a Monterrey, Nuevo León. Para 1958, Biagi y colaboradores confirmaron el quinto caso de enfermedad de Chagas en Tutuapan, estado de México. Posteriormente Palencia y Montañó (1959), también reportaron un nuevo caso de tripanosomiasis en Guaymas, Sonora; Biagi y colaboradores, en 1964, encontraron individuos con enfermedad de Chagas en Tetitlán, Guerrero; así también se encontró a Triatoma phyllosoma mazzottii (vector), altamente infectado por T. cruzi. En 1967, Cuarteto, Ponce y Recio, informaron de cinco casos más de enfermedad de Chagas en los

estados de Jalisco y Zacatecas. Para 1969, Tay y colaboradores efectuaron una revisión sobre el conocimiento de la infección por T. cruzi en México, encontrándose que de acuerdo a las regiones del país, en donde se ha reportado la presencia de T. cruzi, ya sea en humanos o en el vector, la enfermedad de Chagas puede situarse a una altitud de 0 a 1800 metros sobre el nivel del mar. En los subsecuentes años se realizaron diferentes estudios epidemiológicos sobre la existencia de la enfermedad de Chagas, así por ejemplo en 1976 en el estado de Chiapas se realizó un estudio que incluyó historias clínicas, electrocardiogramas, exámenes de sangre en fresco, frotis de gota gruesa, xenodiagnóstico y la búsqueda de transmisores y reservorios. De estos estudios se encontró positividad en la prueba de xenodiagnóstico (16 y 20%), gran presencia domiciliar de Rhodnius prolixus y gran antropofilia del transmisor (Ortega, Beltrán y Zavala, 1976). En 1978 Goldsmith y colaboradores, realizaron una encuesta en los bancos de sangre de la ciudad de Oaxaca, encontrando que el 4.4% de los donadores tenían anticuerpos contra T. cruzi. Además en este mismo año, Ramos y colaboradores realizaron investigaciones con ratones infectados con T. cruzi, observando inmunosupresión de la respuesta humoral primaria y secundaria, para antígenos dependientes de células T e independientes de células T (Ramos y col., 1978). En 1979, Ramos, Shädtler-Siwon y Ortiz-Ortiz observaron inmunosupresión causada por T. cruzi (cepa Cocula) en células T de bazo de ratón. También en

1979, Tay y colaboradores efectuaron un estudio epidemiológico en el estado de Jalisco, observándose que el 20% de las viviendas presentaban al insecto vector, Triatoma barberi y de éstos el 62% estaba infectado con T. cruzi. A la par, Villacampa y Willis llevaron a cabo otros estudios inmunológicos, en donde se mostró que T. cruzi presentaba un recubrimiento de proteínas del hospedero, como un mecanismo de evasión de la respuesta inmune (citado en Velasco-Castrejón y col., 1992). En 1980, se realizó el primer estudio acerca del desarrollo morfológico de los diferentes estadios de T. cruzi (cepa Tetitlán) *in vivo* e *in vitro* (Tay, 1980). También en este año, se volvieron a evaluar los resultados epidemiológicos iniciados en los años de 1971 y 1973 en el estado de Oaxaca. En 1971 el estudio de prevalencia serológica de anticuerpos contra T. cruzi fue de 76, 58 y 51% en Cerro del Aire, Chila y Tataltepec respectivamente; para 1980 se encontró una prevalencia del 58% en Cerro del Aire. Al comparar los electrocardiogramas de 1973 y 1980, se denotaron pocos cambios, sugiriendo una progresión mínima de patología cardíaca durante el intervalo del estudio (citado en Goldsmith y col., 1985). Ortega en 1980, determinó los patrones isoenzimáticos de diferentes aislados mexicanos de T. cruzi, encontrando una gran homogeneidad entre ellos. Para 1981 se reportó el hallazgo de una cepa mexicana de T. cruzi (DP), localizada preferentemente en el área peritoneal del ratón (Martínez y Martín, 1981). En 1983 se llevó a cabo un nuevo estudio seroepidemiológico en varias comunidades del

estado de Chiapas, encontrándose un 28% de seropositividad de las personas investigadas en la población de Agua Azul Chiquito, 14% de la población de León Brindis, y 5.8% de otras tres comunidades (Goldsmith y col., 1983). Por ese año se encontró la presencia de Triatoma barberi en los estados de Querétaro y Guanajuato, lo cual no había sido reportado con anterioridad (Salazar y col., 1983). En 1984, Salazar y colaboradores estudiaron la seroepidemiología en diferentes localidades del estado de Oaxaca, encontrándose una seropositividad de 9.17 a 77.77 % (Salazar y col., 1984a). Así también en este año, Salazar y colaboradores dieron a conocer el primer caso de megaesófago causado por T. cruzi en el estado de Oaxaca, confirmándose por medio de serología, sus antecedentes epidemiológicos, los datos clínicos y la histopatología (Salazar y col., 1984b). En lo que respecta a los padecimientos de la enfermedad de Chagas, en el Instituto Nacional de Cardiología Carlos Chávez, se han reportado 39 casos de cardiopatía chagásica, en el período que va de 1977 a 1988, de estos casos, uno fue agudo, tres subagudos y el resto crónicos. Los pacientes eran provenientes de los estados de Oaxaca, Veracruz, Guerrero, Estado de México, Tabasco, Campeche, Chiapas, Hidalgo, Michoacán, Morelos, Nayarit y San Luis Potosí (Gloss y col., 1990).

En los últimos años muchos grupos han empezado a estudiar la Enfermedad de Chagas en México, además de los que ya la estudiaban, así Zavala-Castro, Velasco-

Castrejón y Hernández en 1992, publicaron su trabajo acerca de la caracterización molecular de aislados mexicanos de T. cruzi utilizando el DNA total. Se encontró heterogeneidad entre estos aislados, en la secuencia no traducida del RNA ribosomal.

### 1.3. Biología de T. cruzi.

#### 1.3.1. Posición taxonómica (Levine y col., 1980).

Reino	: Protista Haeckel, 1866
Subreino	: Protozoa Goldfuss, 1818, emd. Vonsiebold, 1846
Phylum	: Sarcostigophora Honingberg y Balamuth, 1963
Subphylum	: Mastigophora Diesing, 1866
Clase	: Zoomastigophorea Calkins, 1909
Orden	: Kinetoplastida Honigberg, 1963 emd. Vickerman, 1976
Suborden	: Trypanosomatina Kent, 1880
Familia	: Trypanosomatidae Doflein, 1911
Género	: <u>Trypanosoma</u> Gruby, 1843
Especie	: <u>Trypanosoma cruzi</u> Chagas, 1909

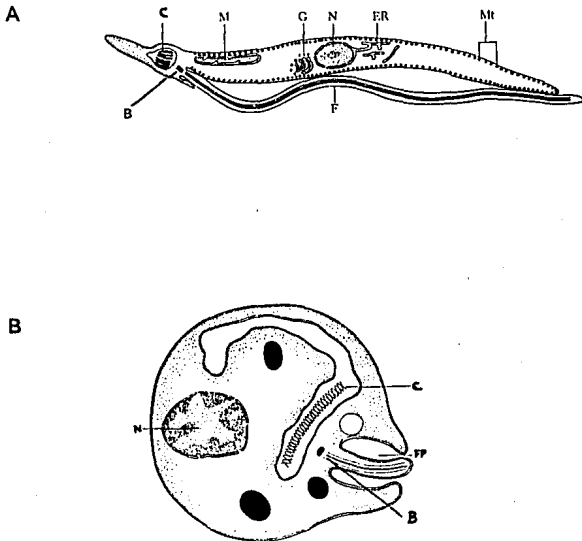
El subphylum Mastigophora incluye a todos los protozoarios que comunmente se conocen como flagelados, se caracterizan por poseer uno o más flagelos, en su forma trofozoide. La mayoría de los flagelados son de vida libre y se encuentran en varios habitats, pero algunos son simblontes tanto en invertebrados como en vertebrados. Muchas de las especies parásitas habitan el tracto digestivo del hospedero, el sistema circulatorio y los tejidos (Cheng, 1986). Generalmente su reproducción es asexual, siendo básicamente por fisión binaria intracinetal; sin embargo en algunos representantes, la reproducción es sexual (Levine y col., 1980).

I. cruzi se incluye en el orden Kinetoplastida, debido a que presentan una estructura característica: el cinetoplasto, el cual se localiza en la región anterior del cuerpo, asociado a la mitocondria; está constituido fundamentalmente por ácidos nucleicos que le confieren la capacidad de autoduplicación. La familia más representativa es la Trypanosomatidae, que incluye formas parásitas del sistema circulatorio, responsables de enfermedades serias del hombre y de animales domésticos. Los miembros de esta familia tienen forma alargada, presentan un solo núcleo y un blefaroblasto del cual se origina un flagelo que forma el margen exterior de la membrana ondulante. Son polimórficos, pudiendo presentar estadios flagelados y no flagelados a lo largo de su ciclo de vida (Cheng, 1986).

**1.3.2. Morfología. *T. cruzi*** en sus diversos hospederos y en medios de cultivo presenta cuatro estadios morfológicos: epimastigotes, tripomastigotes, amastigotes y promastigotes (Schmidt y Roberts, 1984; Sleight, 1989); pero generalmente sólo se consideran a los tres primeros estadios (Wyler, 1990).

El **tripomastigote** es un flagelado de cuerpo alargado que mide de 20-25  $\mu\text{m}$  de longitud y 2  $\mu\text{m}$  de ancho, presenta un gran núcleo centrovacuolar, cinetoplasto subterminal posterior al núcleo y el cual está formado principalmente por DNA y se encuentra asociado a una gran mitocondria. El flagelo está adherido a la membrana ondulante del parásito y sale libre en la porción anterior para moverse activamente como un chicote. Este estadio morfológico se le encuentra en la sangre de mamíferos y en el intestino posterior de los triatóminos infectados como tripomastigotes metacíclicos, es la forma infectante para los mamíferos, así como para los triatómos cuando éstos chupan sangre de un animal u hombre infectados (Fig. 2A).

El **epimastigote**, es de aspecto fusiforme, con 20 a 40  $\mu\text{m}$  de longitud y, el cinetoplasto se encuentra anterior al núcleo, el flagelo forma una pequeña



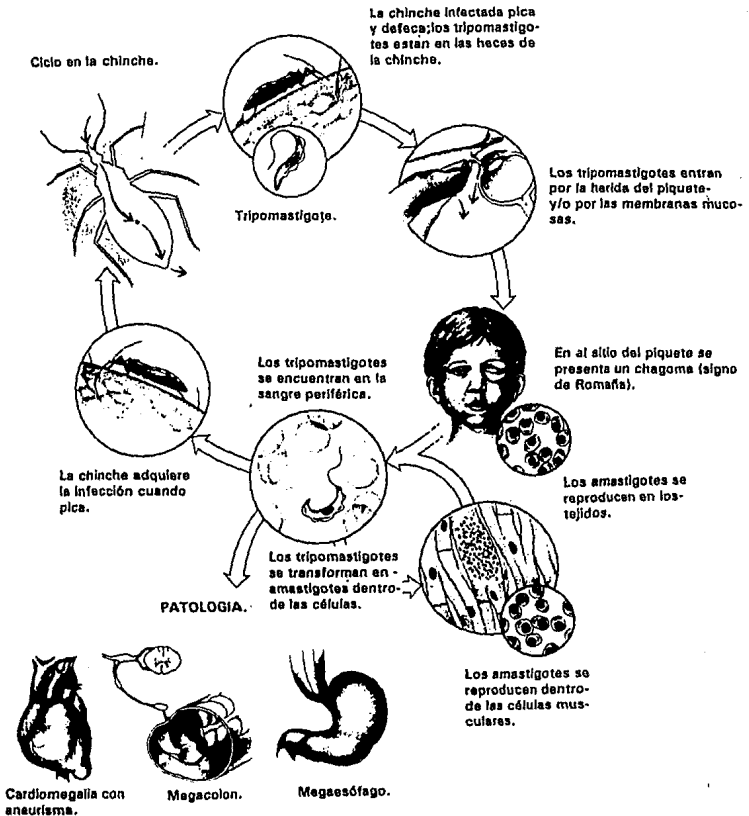
**Fig. 2. ULTRAESTRUCTURA DE *T. cruzi*.** A) Tripomastigote y B) Amastigote. C, cinetoplasto; M, mitocondria; G, Aparato de Golgi; N, núcleo; ER, retículo endoplasmático; Mt, microtúbulos submembranales; B, blefaroblasto; F, flagelo; FP, bolsa flagelar (tomado de Wyler, 1990).



membrana ondulante. Este estadio morfológico se multiplica en el intestino de los triatóminos profusamente, para dar lugar a los tripomastigotes metacíclicos, así como también en los medios de cultivo.

El amastigote, es la forma redondeada, mide de 2-3.5  $\mu\text{m}$ , sin flagelo libre, al microscopio electrónico el flagelo se ve dentro de una bolsa; además presenta un núcleo y cinetoplasto. Este estadio morfológico se encuentra en el interior de las células del hospedero mamífero y ahí se multiplica profusamente (Fig. 2B) (Tay y col., 1984, Wyler, 1990).

**1.3.3. Ciclo biológico.** Una vez que los tripomastigotes metacíclicos (liberados con las deyecciones del triatoma al momento de alimentarse) penetran en la piel del vertebrado hospedero a través de punciones o abrasiones cutáneas, se introducen en las células de tejido laxo, vecino al sitio de la penetración y adquieren la forma de amastigote. Los amastigotes se multiplican por fisión binaria, repletan la célula, que termina por romperse, y los parásitos salen a la circulación bajo el aspecto de tripomastigotes diseminándose por todo el organismo. Estos tripomastigotes penetran en nuevas células, se transforman en amastigotes para reproducirse, rompen las células repletas del parásito y vuelven a circular como tripomastigotes, repitiéndose muchas veces este ciclo. El ciclo biológico se completa cuando los



**FIG. 3. CICLO DE VIDA DE *T. cruzi*.** Se muestran las diferentes fases de desarrollo de *T. cruzi* en el vector y en el hospedero humano (Tomado de Katz, Despomnier y Gwadz, 1988).

tripomastigotes son ingeridos por los triatomas hematófagos. En suma, en los triatomas la infección es del tubo digestivo, con tripomastigotes en el intestino anterior y posterior, y con epimastigotes en el intestino medio. En el mamífero la infección es sanguínea y tisular (Fig. 3) (Athías y Neghme, 1984).

#### **1.4. Mecanismos de Transmisión.**

La transmisión de esta enfermedad se da habitualmente a través de triatóminos vectores y por contaminación de la piel y mucosas con las deyecciones del insecto como se ha mencionado en el ciclo biológico; también se transmite por hemotransfusión proveniente de individuos infectados con T. cruzi, este último mecanismo es el responsable de alrededor de 20% de los casos de tripanosomiasis americana. Otros mecanismos de transmisión menos comunes lo constituyen la vía transplacentaria, el trasplante de órganos, la ingesta de leche materna, accidentes de laboratorio, el desollamiento de animales silvestres y la ingestión de carne parasitada semicruda o de bebidas contaminadas con material fecal de triatomas (Velasco-Castrejón y col., 1992).

### **I.5. Vectores de T. cruzi en México.**

En la República Mexicana se distribuyen un mínimo de 25 especies del género Triatoma, una del género Rhodnius, una del género Dipetalogaster, dos del género Paratriatoma, una del género Panstrongylus, dos del género Belminus y dos del género Eratyrus. En total, 34 especies de triatóminos pertenecientes a siete géneros distribuidas en todos los estados, en su mayor parte ubicados en la vertiente del Pacífico, lo que hace suponer que la zona probablemente endémica abarque cerca de las dos terceras partes del territorio; sin embargo es probable que el número sea mucho mayor y la distribución más amplia, pero el atraso mexicano en el estudio de la tripanosomiasis americana ha impedido su conocimiento. Por su mayor distribución geográfica y domesticidad, las especies mexicanas de mayor importancia son: R. prolixus, T. barberi, T. dimidiata, T. phyllosoma, T. longipennis y T. picturata (Schenone y Rojas, 1989; Velasco-Castrejón, y col., 1991).

### **I.6. Patología.**

La Enfermedad de Chagas causada por T. cruzi aparece en forma aguda específicamente en los niños, y en estado crónico principalmente en las personas adultas.

**Estado agudo**, muchas veces es asintomático, pero cuando hay signos consisten en una hinchazón, generalmente en uno o en ambos párpados (signo de Romaña), por donde los tripomastigotes metacíclicos han entrado en los tejidos, en el punto de picadura de las chinches. Las hinchazones inflamatorias en los puntos de alimentación de las chinches se conocen como chagomas. Más tarde hay adenitis, aumento del tamaño de los ganglios linfáticos cervicales y de otras regiones, y del bazo. Son prevalentes la anemia, el dolor de cabeza y la fiebre, también hay muchos tipos de bloqueo cardíaco. La tasa de mortalidad en el estado agudo es probablemente menos del 10%. Los niños afectados mueren por meningoencefalitis, fallas cardíacas o de bronconeumonía.

**Estado indeterminado**, es asintomático y revisándose con detalle sí hay afecciones cardíacas, frecuentemente se revelan cambios patológicos indicando el inicio de miocarditis chagásica (síntomas crónicos). No obstante se sugiere la terminación de inflamación activa con ausencia de anomalías en el electrocardiograma y un tracto digestivo normal.

**El estado crónico**, se caracteriza por alteraciones cardíacas y gastrointestinales. Las anomalías del corazón incluyen palpitaciones recurrentes, insuficiencia cardíaca, cardiomegalia y por consecuencia cambio en el electrocardiograma,

también se presenta aumento de tamaño del esófago y del colon, con alteraciones del movimiento peristáltico (Hudson y Britten, 1985).

#### 1.7. Cultivo de T. cruzi in vitro.

T. cruzi puede ser cultivado in vitro en una gran variedad de medios libres de otros tipos celulares (Axénicos), ya sean medios bifásicos o medios líquidos monofásicos e inclusive en medios químicamente definidos. Los laboratorios generalmente usan uno o dos medios para mantener y crecer a T. cruzi (Chiari y Camargo, 1984), siendo de gran utilidad para el estudio del parásito, pues se obtienen grandes cantidades que son requeridas por muchas disciplinas de la ciencia y que en otros momentos era casi imposible obtener (Arévalos, Panebra y Santa Cruz, 1985). El primer medio de cultivo empleado para el cultivo de T. cruzi fue el medio de Novy y Mac Neal (medio complejo), el cual fue utilizado por Carlos Chagas en 1909. Después de la utilización de este medio se iniciaron una serie de estudios para encontrar un medio definido. Tales esfuerzos dieron como resultado el desarrollo de diferentes medios de cultivo parcialmente definidos (Azevedo y Roitman, 1984); como es el caso del realizado por Little y colaboradores en los años cuarenta, este medio consistía en un filtrado de una mezcla de peptona y

ácidos Casamino, además de factores de crecimiento y sangre coagulada de conejo. Esta mezcla fue mejorada, sustituyendo la peptona y los ácidos Casamino por aminoácidos, vitaminas, glucosa y compuestos misceláneos (adenina, uracilos, urea, purinas y piriminas, etc.) (citado en Brener, 1973). De esta manera se pueden enumerar muchos otros medios parcialmente definidos y definidos; así en 1975, Yoshida desarrolló un medio libre de macromoléculas, en el cual todos los componentes estaban definidos con la excepción del dializado de infusión de hígado. Avila y colaboradores (1979), reportaron el cultivo continuo de *T. cruzi* en un medio definido suplementado con catalasa de hígado de bovino; tal medio fue usado para la determinación de los requerimientos de nucleótidos y vitaminas. En los años ochenta Azevedo y Roitman hicieron una modificación del medio HX-25 de Cross y Manning, reduciéndolo a 56 componentes y dándole el nombre de AR-103. En este medio, los epimastigotes son las formas predominantes, aunque los tripomastigotes pueden ser encontrados por envejecimiento en el cultivo. Las cepas cultivadas son: Y, Buriti, CL, FL y GAS; el máximo crecimiento de la cepa Y fue de  $2.5 \times 10^7$  parásitos/ml (Azevedo y Roitman, 1984). Aun con el conocimiento de un sin fin de medios de cultivos hay una serie de problemas para elegir el medio adecuado, ya que los medios como se ha dicho pueden ser indefinidos, definidos, parcialmente definidos y muchas veces la preparación del medio resulta una rutina muy complicada, por otro lado *T. cruzi* también puede ser cultivado en cámaras

implantadas subcutáneamente en ratones (Contreras y col., 1985; Sullivan, 1982). En lo que concierne a las propiedades de los medios de cultivo se ha visto que muchos de ellos soportan en primera instancia el crecimiento de epimastigotes, el estadio que se está dividiendo y que está confinado al vector, y otros medios permiten la diferenciación de epimastigotes (estadio no infectivo) a tripomastigotes metacíclicos (estadio infectivo), el paso de un estadio a otro se conoce como metacicloogénesis. Los medios que se han empleado en muchos laboratorios son el medio LIT (Liver Infusion Tryptose), el medio TAU (Triatome Artificial Urine) y el medio Grace (empleado en el cultivo de tejidos de insecto).

El medio LIT, fue inicialmente realizado por el Dr. Yaeger, de la Universidad de Tulane, a principios de los años sesenta y el primer reporte de crecimiento fue dado por Camargo en 1964. El cultivo de T. cruzi en medio LIT ha sido mantenido por casi 20 años (citado en Chiari y Camargo, 1984). La fórmula de este medio incluye a la hemina, que es una fuente importante de fierro para el parásito, además se ha visto que incrementa la tasa de crecimiento, así como la diferenciación de epimastigotes a tripomastigotes en cultivo (Arévalos, Panebra y Santa Cruz, 1985; Vargas, 1992).

El medio TAU a diferencia del medio LIT es un medio que no permite la replicación del parásito, pero sí induce la metacicloogénesis; los electrólitos que componen al medio TAU, así como la concentración se basaron en la probabilidad



de su presencia en el intestino posterior del vector triatómino, determinado por estudios previos de la orina del triatómino y de otros fluidos corporales. Entre los componentes importantes para la inducción de metaciclo génesis tenemos al  $\text{Ca}^{2+}$  y al  $\text{K}^+$  que tienen funciones de segundos mensajeros (Krassner y col., 1991), por otro lado es importante el tipo de aminoácido que se emplee; un buen inductor de la metaciclo génesis es la L-prolina, pues puede actuar como fuente de energía para que se de esta transformación; otro punto importante es el aporte de  $\text{CO}_2$ , el cual parece tener el papel de activador de metaciclo génesis (Contreras y col., 1985; Homsy, Granger y Krassner, 1989; Krassner y col., 1990).

El medio Grace, al igual que el medio TAU se ha empleado para inducir metaciclo génesis, su fórmula originalmente se utilizó para el cultivo de tejidos de insectos, tal fórmula se derivó del medio Wyatt (Grace, 1962), el cual semeja la hemolinfa de Antheraea eucalypti y en un principio se utilizó para el cultivo de células constituyentes de este insecto. Actualmente el medio Grace se sigue usando para el cultivo de células de insecto, además su uso se ha extendido en el cultivo de parásitos hemoflagelados como Leishmania sp y T. cruzi. En el caso de T. cruzi se ha visto que induce metaciclo génesis en un rango de 44 a 91%, por otro lado también permite el crecimiento del parásito (Hendricks, Wood y Hajduk, 1978; Dusanic, 1980; Sullivan, 1982).

La influencia de estos medios en cuanto al soporte de crecimiento e inducción de metaciclo génesis muchas veces puede diferir dependiendo de la cepa de T. cruzi de que se trate, así como del tiempo que han permanecido las cepas en cultivo (Contreras y col., 1985).

### **1.8. Metaciclo génesis.**

El fenómeno de metaciclo génesis como se ha mencionado anteriormente consiste en la diferenciación del estadio no infectivo epimastigote, al estadio infectivo tripomastigote. Tal fenómeno involucra una serie de cambios morfológicos que repercuten en la fisiología del parásito. Los cambios morfológicos que se efectúan son a nivel de la presencia de membrana ondulante y a la posición del cinetoplasto; encontrándose que de una membrana que empieza a ser ondulante y de un flagelo que corre a lo largo de ésta y de la presencia de un cinetoplasto anterior al núcleo en epimastigotes, cambia sus características morfológicas cuando se da la transformación al estadio infectivo, tripomastigote, ya que la membrana es totalmente ondulante, el flagelo es libre y la posición del cinetoplasto se torna posterior al núcleo (Schmidt y Roberts, 1984; Cheng, 1986). Esta transformación esta acompañada por cambios a nivel de los componentes de la membrana celular,

como son: proteínas (Joiner y col., 1986), ácidos grasos (Esteves y col., 1989) y carbohidratos (De Andrade y col., 1991) e involucra expresión genética diferencial, ya que la diferenciación a tripomastigote (inducida en cultivo) y su habilidad de desarrollarse en la célula hospedera (macrófagos), depende de diferentes genes (Contreras y col., 1985).

Se puede observar que en epimastigotes y tripomastigotes se presenta una glicoproteína membranal de 72KD (GP72) que interviene en la regulación de la activación de la vía alterna del complemento, tal glicoproteína tiene diferentes funciones en los dos estadios, pues en la fase de epimastigotes la GP 72 actúa como receptor principal de C3b y su interacción influye en la fijación de otras proteínas del complemento, además de unir el factor B y de participar en la formación de C5 convertasa para finalmente conducir al ensamblaje de C5b-9, presentándose la lisis en este estadio; en tanto que en la fase de tripomastigote ocurre lo contrario a lo visto en epimastigotes, ya que es un pobre receptor de C3 convertasa, al no poder unir al factor B, lo que da como resultado que no se produzca la lisis celular como consecuencia de la producción de un fragmento hemolíticamente inactivo iC3b, no participando en la formación de C5 convertasa, ni al ensamblaje de C5b-9 (Joiner y col., 1986). Estos mismos autores han explicado diferentes mecanismos por los que se puede o no dar la unión del factor B a C3b en epimastigotes y tripomastigotes y uno de ellos sugiere que el principal

aceptor de C3 en tripomastigotes metacíclicos es una molécula de 25-30 KD, en tanto que en epimastigotes es la GP72.

En lo que respecta a los lípidos se ha visto que son también determinantes de propiedades estructurales y fisiológicas de las membranas biológicas, y los cambios en la composición lipídica de las membranas pueden producir modificaciones funcionales; en T. cruzi, Esteves y colaboradores (1989) han mostrado que la composición de los ácidos grasos se ve modificada con la diferenciación de epimastigote a tripomastigote metacíclico. Estos autores utilizaron la clona Dm28c cultivada en medio LIT (epimastigotes replicativos), en medio TAU (epimastigotes diferenciados) y medio TAUP (tripomastigotes metacíclicos); los resultados en cuanto a los ácidos grasos presentes en cada estadio de T. cruzi fueron los siguientes: en epimastigotes replicativos se encontraron dos ácidos, el ácido mirfístico y el ácido linoleico; en epimastigotes diferenciados se encontraron también dos ácidos, el ácido palmítico y el ácido linoleico, no presentándose ácido mirfístico; el grado de insaturación fue menor en epimastigotes diferenciados y tripomastigotes metacíclicos a diferencia de los lípidos en epimastigotes replicativos; (un decremento en el grado de insaturación puede afectar en la fluidez membranal). Tal fenómeno puede representar parte del proceso general para la inducción de metacicloogénesis de T. cruzi. La transformación de epimastigotes diferenciados a

tripomastigotes metacíclicos se llevó a cabo con mínimas variaciones de los ácidos grasos, observándose que los ácidos palmítico y palmitoleico disminuyeron, en tanto que el ácido linoleico aumentó. De estos resultados se observó que la mayoría de los cambios que se dieron a nivel de la composición lipídica fueron antes de que se produjera la transformación morfológica de epimastigotes a tripomastigotes metacíclicos (Esteves y col., 1989).

Otro cambio que se da en el proceso de metacicloogénesis, como se ha mencionado, es a nivel de carbohidratos, para observarlo De Andrade y colaboradores (1991) estudiaron a los diferentes estadios de la clona Dm28c, empleando también los mismos medios de cultivo y variantes que en el estudio de ácidos grasos. En este estudio se utilizaron diferentes lectinas, específicas para receptores que contienen moléculas de ácido siálico, N-acetilglucosamina (D-GlcNAc), N-acetilgalactosamina (D-GalNAc), galactosa (D-Gal), residuos afines a manosa (D-Man) o L-fucosa (L-fuc). La D-GalNAc, unió a las lectinas: BS-I (obtenida de *Bandeiraea simplicifolia* I), aglutinando de manera selectiva a los tripomastigotes metacíclicos (inducidos en medio TAUP); a la lectina MPL (obtenida de *Maclura pomifera*), la cual seleccionó a los epimastigotes replicativos (medio LIT); y a la lectina SBA (obtenida de *Glycine max*), observándose una gran aglutinación de todos los estadios de desarrollo de *T. cruzi*. La lectina WGA (obtenida de *Triticum vulgare*) fue específica para ácido siálico y/o D-GlcNAc, presentándose reactividad

con epimastigotes diferenciados y tripomastigotes metacíclicos; sin embargo, ésta fue más alta con epimastigotes replicativos. En lo que concierne a otras lectinas como la jacalina (obtenida de Artocarpus integrifolia), que es específica para D-Gal, se observó un decremento en la aglutinación durante el proceso de metacicloogénesis, lo cual no sucedió con la lectina RCA-I (obtenida de Ricinus communis), que también es específica para D-Gal, ya que incrementó la aglutinación de los parásitos en diferenciación. Las diferencias más grandes en la actividad de aglutinación fueron observadas entre epimastigotes replicativos y diferenciados, sugiriendo con ello que los cambios en la composición de carbohidratos de superficie preceden a la transformación de epimastigotes a tripomastigotes metacíclicos, de manera semejante a lo que sucede con los ácidos grasos (De Andrade y col., 1991).

Los cambios mencionados confieren gran ventaja al parásito en su estadio de tripomastigote, pues lo acondiciona morfológica y funcionalmente para llevar a cabo la iniciación de la infección de su hospedero vertebrado, escapando a la respuesta inmune generada por el hospedero, como es el caso de la evasión del complemento.

### 1.9. Interacción célula hospedera-T. cruzi.

La interacción de T. cruzi con su célula hospedera ha sido estudiada in vitro desde 1935 y en los últimos años se han vuelto a concentrar los esfuerzos, pues es la base para entender la patología in vivo y la respuesta inmunológica a la infección (De Araújo-Jorge, 1989).

El estudio in vitro de la interacción de las diferentes cepas de T. cruzi con la célula hospedera, no cuenta con información completa de los mecanismos bajo los cuales se da tal interacción, ya que resulta difícil y caro, aislar, crecer y mantener a dichas cepas.

La reproducción de T. cruzi en el hospedero vertebrado frecuentemente ocurre dentro de la célula hospedera y tiene la habilidad de invadir casi cualquier célula in vitro, pero in vivo hay tropismo selectivo en especial hacia las células mononucleares del sistema fagocítico es decir, monocitos y macrófagos (Williams y Remington, 1977; Kress y col, 1977; Kipnis, Galich y Da Silva, 1979; De Meirelle, De Araújo-Jorge y De Souza, 1980; Sanderson, Thomas y Twomey, 1980; De Meirelles, De Araújo-Jorge y De Souza, 1982; Andrews y Colli, 1982; De Castro y De Meirelles, 1986; Alcina y Fresno, 1987 a y b; Boschetti y col.,

1987; De Araújo-Jorge 1989; Mortara, 1991; Tardieux y col., 1992). Así existen evidencias del parasitismo de T. cruzi a macrófagos en ratones inoculados con ciertas cepas, observándose infección selectiva en macrófagos del bazo, hígado y médula ósea (Souto-Padrón y De Souza, 1989).

En el proceso de interacción célula hospedera-T. cruzi se ha visto que hay dos posibles modelos de entrada a la célula hospedera. El parásito puede unirse y activamente penetrar en las células o puede ser fagocitado por macrófagos para después escapar del fagosoma e iniciar su replicación en el citoplasma (Snary, 1985). Recientemente se ha observado un mecanismo distinto al fagocítico clásico en células de riñón de rata (NRK) y en células epiteliales de riñón de perro (MDCK), pues se ha observado que los lisosomas se agrupan en el sitio de ataque de los tripomastigotes, y se empiezan a fusionar con la vacuola que envuelve al parásito (este fenómeno se presenta en etapas tempranas de la formación de la vacuola), lo cual facilita la invasión del parásito. El movimiento de tales lisosomas al área perinuclear (sitio de ataque de los tripomastigotes) se lleva a cabo a través de los microtúbulos presentes en el citoplasma de la célula hospedera (Tardieux y col., 1992).

La interacción que se da con un parásito y una célula fagocítica puede ser diferente a la que se da con el parásito y una célula no fagocítica, dependiendo de la cepa del parásito (Snary, 1985). En este sentido las cepas con alto porcentaje



de tripomastigotes serían las que poseen más capacidad para infectar cultivos celulares no fagocíticos; sin embargo, esta capacidad parecería estar relacionada no sólo con características morfológicas. In vitro, aún dentro de cepas mixotrópicas se han encontrado diferencias en el tejido muscular específico invadido. Además se han encontrado diferencias en la susceptibilidad a la infección que dependerán de la constitución genética del hospedero, habiéndose descrito, por ejemplo, algunas cepas de ratones con baja y otras con alta susceptibilidad a la infección por T. cruzi. La fase de crecimiento en la que se encuentre la célula hospedera tendrá importancia en el mayor o menor éxito de la penetración (Segura y Cappa, 1985).

En la interacción T. cruzi- macrófago, se puede observar que el parásito presenta en su superficie glicoconjugados y/o componentes del plasma unidos o absorbidos a su membrana, los cuales pueden interactuar con receptores presentes en la superficie de los macrófagos. Los macrófagos expresan muchos receptores que median la fagocitosis, entre ellos tenemos a los receptores para la porción Fc de diferentes isotipos de inmunoglobulinas (FcR), tres receptores para los componentes del complemento (CR1, CR2 y CR3 para C3b/C4b, C3d y iC3b respectivamente), también presentan receptores para fibronectina y para el complejo proteasa-alfa-2-macroglobulina (A2M-R) y receptores afines a las lectinas que reconocen residuos de azúcar (citado en De Araújo-Jorge, 1989).

Experimentos realizados in vitro indican que los tripomastigotes pueden o no

tener acceso a la célula a través de la vía Fc o CR1 (Zenian y Kierszenbaum, 1983). La incubación del parásito con suero inmune, aumenta su ingestión vía FcR, y la incubación con complemento da resultados similares (usando macrófagos activados), por otro lado el tratamiento de macrófagos con anticuerpos en contra de FcR inhibe la ingestión de tripomastigotes a los cuales se les adhirió IgG (Noguelra y Cohn, 1976). La penetración a través del receptor C3b condujo a la multiplicación intracelular; el receptor IC3b estimuló al macrófago para la eliminación del parásito, mediante la activación de la explosión metabólica [producción de compuestos tóxicos ( $H_2O_2$  y  $O_2$ ) para el parásito]. Otra manera por la cual *T. cruzi* puede entrar a los macrófagos puede ser a través de un receptor para fibronectina FnR, tanto los macrófagos como los parásitos expresan sitios de unión para fibronectina. El ataque a fibronectina por *T. cruzi*, se encontró que es mediado por un tetrapéptido (arginina-glicina-ácido aspartico-serina) (Ouaisi y col., 1986). La previa incubación de alguno o de los dos (parásito o célula) con fibronectina aumenta la infección celular *in vitro* (Wirth y Kierzenbaum, 1984; Ouaisi, Cornette y Capron, 1985) y la presencia de anticuerpos en contra de fibronectina impide la internalización de *T. cruzi* (Ouaisi y col., 1985). Por otro lado el efecto de A2M sobre el parásito parece ser de una proteasa inhibitoria, similar a la inhibición por tripsina, impidiendo la habilidad del parásito para el proceso proteolítico de algunos componentes de su superficie, que son necesarios para

mediar su unión y/o internalización a la célula hospedera (De Araújo Jorge, 1989). Además se han encontrado receptores para lectinas en macrófagos, estos receptores reconocen específicamente a los residuos de carbohidratos, que se presentan en macromoléculas o en ligandos celulares. Así en los macrófagos se encuentran presentes los receptores para Manosa, N-acetil-D-glucosamina /fucosa (Man-R), la Galactosa/ N-acetil-D-galactosamina (Gal-R) y la Manosa-6-Fosfato (Man-GP-R). Se ha visto que cuando alguno de estos azúcares se adiciona al medio en donde se lleva a cabo la interacción, se inhibe el ataque de epimastigotes y tripomastigotes (dependiendo de la cepa), sugiriendo con ello que estos receptores pueden mediar la unión y ataque de T. cruzi (De Araújo-Jorge y De Souza, 1984; Stahl y col., 1984; Kolb-Bachofen y col., 1984; Neufeld y Ashwell, 1979).

En lo que concierne a los componentes superficiales de T. cruzi involucrados en el reconocimiento por macrófagos, es de gran importancia la superficie de tripomastigotes obtenidos de orígenes diferentes, ya que pueden diferir en los sitios de unión para el reconocimiento por macrófagos, además de que la infección in vitro varía (De Melrelles, Chiari y De Souza, 1982; Kloetzel, Morales y Umezawa, 1982). Así se han observado diferentes ligandos y receptores que están envueltos en el paso de unión e internalización de T. cruzi a macrófagos (Ayala y Kierszenbaum, 1987). Los residuos de Gal y Gal-NAC que se encuentran en la

superficie del parásito, son importantes para el reconocimiento de *T. cruzi* por macrófagos (Villalta y Kierszenbaum, 1983, 1984, y 1985; De Araújo-Jorge y De Souza, 1984 y 1986). Otro elemento importante para el reconocimiento por macrófagos son las proteasas del parásito, las cuales actúan como ligandos para los receptores de los macrófagos (De Araújo-Jorge, Sampaio y De Souza, 1986). La acción de las proteasas se ha visto cuando es adicionada exógenamente a los co-cultivos de parásitos-macrófagos, observándose mayor ataque de los macrófagos (Nogueira y col., 1980; Kipnis y col., 1981; De Araújo-Jorge y De Souza, 1984).

#### **I. 10. Heterogeneidad en *T. cruzi*.**

Las diferentes cepas o aislados de *T. cruzi* han mostrado ser altamente heterogéneas, ya que tienen distintas características biológicas, refiriéndose a tropismo celular, infectividad, patogenicidad (Giovanni-De-Simone y col., 1987) y crecimiento; Así también se han determinado patrones isoenzimáticos de diferentes cepas provenientes de varios países, que muestran claramente una gran variabilidad genética entre ellas (Tibayrec y col., 1986; Tibayrec y Ayala., 1988). Además se han observado diferencias en cuanto al contenido de DNA total, a la digestión del

DNA del cinetoplasto por enzimas de restricción, y al reconocimiento por anticuerpos monoclonales (Snary, 1985); por otro lado Snary ha sugerido que la variabilidad podría extenderse a otras propiedades, como la interacción con los receptores del hospedero. Además se ha visto que hay variabilidad en la respuesta a la quimioterapia por diferentes cepas de T. cruzi tratadas con Benznidazole y Nifurtimox (Andrade, Magalhaes y Pontes, 1985). En 1987, Engman y colaboradores observaron heterogeneidad a nivel molecular de cariotipos; en 1990, Dietrich y colaboradores han observado variabilidad genética en su estudio de restricción de un gran fragmento polimórfico de la secuencia espaciadora del RNA ribosomal. En cuanto a aislados mexicanos la información es muy escasa, sólo dos estudios se han realizado en este sentido. En 1980, Ortega y colaboradores determinaron patrones isoenzimáticos de 5 aislados mexicanos encontrándose una gran homogeneidad. Recientemente Zavala-Castro, Velasco-Castrejón y Hernández (1992), contrario al estudio anterior han mostrado heterogeneidad en 17 aislados mexicanos de T. cruzi a nivel genético mediante el estudio del DNA total y del cinetoplasto, relacionándose esta heterogeneidad con el origen geográfico de los parásitos estudiados.

## II. OBJETIVOS.

### Objetivo General:

- Estudiar la heterogeneidad de cepas mexicanas de T. cruzi con respecto a las características de crecimiento, metacicloogénesis, infectividad y virulencia in vitro.

### Objetivos particulares:

- a) Determinar que medio de cultivo es el más apropiado para obtener mayor crecimiento y metacicloogénesis poblacional in vitro de diferentes cepas mexicanas de T. cruzi.
- b) Evaluar la infectividad y virulencia de cepas mexicanas de T. cruzi en células fagocíticas (P388) y no fagocíticas (Vero).
- c) Hacer una comparación en cuanto a metacicloogénesis, crecimiento, infectividad y virulencia de cepas mexicanas de T. cruzi con respecto a cepas sudamericanas de referencia.

### III. METODOLOGIA.

Para el desarrollo del presente trabajo de investigación se emplearon distintas cepas de Trypanosoma cruzi aisladas de vectores y de humanos infectados. En total se estudiaron 22 cepas de las cuales 17 fueron mexicanas y cinco sudamericanas (Tabla I). Las cepas fueron proporcionadas por el Dr. Roberto Hernández, adscrito al Departamento de Biología Molecular en el Instituto de Investigaciones Biomédicas (UNAM).

#### III.1. Cultivo Celular.

**III.1.1. Parásitos. Estado de epimastigote:** La forma de epimastigote se mantuvo en el medio LIT (Liver Infusion Tryptose) (Chiari y Camargo, 1984. Apéndice I), a pH 7.2, suplementado con 25  $\mu\text{g/ml}$  de hemina (SIGMA) y 10% de suero fetal de bovino (SFB; GIBCO) inactivado a 56° C, durante 30 min. Las diferentes cepas se incubaron a 28°C en frascos Erlenmeyer de 250 ml, conteniendo 5 ml de medio LIT y un total aproximado de  $5 \times 10^6$  parásitos/ml. Se siguieron subcultivando cada semana, tomándose 1 ml del cultivo original.

TABLA I. CEPAS DE *Trypanosoma cruzi* CULTIVADOS IN VITRO.

NOMBRE	PROCEDENCIA	ORIGEN
C4	JALISCO	<i>Triatoma barberi</i>
EA	MORELOS	HUMANO
ZACATECAS	ZACATECAS	HUMANO
CID	OAXACA	HUMANO
FRV	OAXACA	HUMANO
NINOA	OAXACA	HUMANO
H1	YUCATAN	HUMANO
H3	YUCATAN	HUMANO
H4	YUCATAN	HUMANO
H5	YUCATAN	HUMANO
H9	YUCATAN	HUMANO
H10	YUCATAN	HUMANO
HG	YUCATAN	HUMANO
T	YUCATAN	<i>Triatoma sp</i>
Z10	YUCATAN	<i>Didelphis marsupialis</i>
Z17	YUCATAN	<i>D. marsupialis</i>
Z21	YUCATAN	<i>D. marsupialis</i>
CL	BRASIL	<i>Triatoma infestans</i>
Y	BRASIL	HUMANO
SILVIO X10 CL1	BRASIL	HUMANO
ESMERALDO CL3	BRASIL	HUMANO
PERU	PERU	HUMANO

Cepas de *Trypanosoma cruzi* empleadas en la realización del presente estudio. El origen de estas cepas fue a partir de reservorios, insectos, y hospederos definitivos.

Una cepa es una población que se origina de un grupo de tripanosomas en un tiempo dado, en un hospedero o cultivo dado y que se ha definido por poseer una o más características establecidas (crecimiento en cultivo, infectividad, parasitemia en ratón y chinche, patrones isoenzimáticos y esquizodemas característicos).

Una clona es un cultivo que se origina a partir de una sola célula, siendo sus características genéticas idénticas.



**Estado de tripomastigote:** Para inducir la metacicloogénesis *in vitro*, que es el proceso de transformación de epimastigote a tripomastigote, fue necesario probar diferentes fórmulas de medios de cultivo. Se emplearon tres medios diferentes: el medio LIT, con dos diferentes concentraciones de hemina, 25µg/ml y 50µg/ml (Arévalos, Panebra y Santa Cruz, 1985; Vargas, 1992) suplementado con 10% de SFB inactivado; el medio TAUP (Triatomina Artificial Urine), suplementado con 10 mM de L-prolina (Contreras y col., 1985; Homsy, Granger y Krassner, 1989; Krassner y col., 1990 y 1991) y el medio Grace, (Apéndice I) medio especial para el cultivo de células de insecto (GIBCO), suplementado con 10% de SFB inactivado, (Grace, 1962; Hendricks, Wood y Hajduk, 1978 y Sullivan, 1982).

**III.1.2. Líneas celulares.** Se emplearon dos diferentes líneas celulares: macrófagos obtenidos de ratón línea P388 y las células epiteliales Vero, que se aislaron de Mono Verde (Proporcionadas por el Dr. Enrique Ortega adscrito al Departamento de Inmunología en el Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM). Los macrófagos P388 se cultivaron en medio RPMI 1640 (GIBCO) a pH 7.3, y las células Vero se cultivaron en medio D-MEM (GIBCO) a pH 7.3. Ambos medios se complementaron con 1% de L-glutamina 0.2 M (GIBCO), 10% de SFB (GIBCO) inactivado y 1.5% de penicilina-estreptomicina (10,000 U/10,000 U. SIGMA). Las

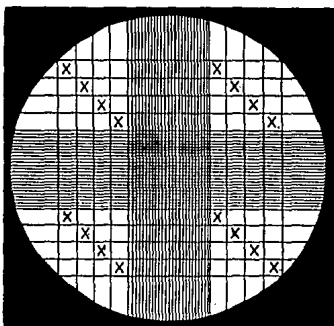
diferentes líneas celulares se crecieron en botellas de cultivo (COSTAR) de plástico con una superficie de 75 cm<sup>2</sup> y un volumen de 200 ml incubándose a 37°C, con una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub> y 95% de humedad.

Para despegar las células de la superficie de las botellas de cultivo, en el caso de la línea P388 se agregaron 3 ml de EDTA 2 mM durante 20 min a 37°C, al término de este periodo se les retiró 2 ml del volumen total y se les dieron cuatro golpes firmes a cada caja, enseguida se les agregó medio RPMI. Las células Vero se despegaron utilizando 500 µl de tripsina (SIGMA) en una concentración de 1 mg/ml de medio RPMI, durante 15 segundos, estas células habían sido lavadas previamente con EDTA 2 mM, finalmente se les agregó medio, en este caso D-MEM para parar la reacción de la tripsina.

### **III.2. Evaluación del Crecimiento Poblacional de los Parásitos en cultivo.**

**III.2.1. Conteo de parásitos.** El crecimiento de los parásitos se registró cada tercer día, por un periodo de 20 días, mediante conteo usando la cámara de Neubauer (Deane, Moriearty y Thomaz, 1984), para ello se tomaron alcuotas de cada cepa cultivada en los diferentes medios y se hicieron diluciones 1:100 en solución amortiguadora de fosfatos (PBS). De cada dilución de parásitos se tomaron 10 µl

y se colocaron en cada ranura de la cámara de Neubauer, posteriormente se hizo el conteo, con ayuda de un microscopio óptico MICROSTAR IV, (Reichert Jung) objetivo 40X. Para ésto se utilizaron los cuadros de las esquinas, que forman un total de 16 en cada esquina, de estos 16 cuadros se contaron solamente los parásitos que quedaron en cuatro cuadros en forma diagonal (Fig. 4) de las cuatro esquinas, siendo en total 16 cuadros que miden  $0.1 \text{ mm}^3$ , éste valor a su vez es multiplicado por  $10^3$  (número en  $1 \text{ mm}^3$ ) y el valor resultante se multiplicó por 10 (número en  $1 \text{ ml}$ ). Finalmente para obtener el valor de parásitos totales por  $\text{ml}$ , se multiplicó por el factor de dilución.



**Fig.4. CAMARA DE NEUBAUER.** Empleada en el seguimiento del crecimiento y metaciclógenésis de *T. cruzi*. Observándose sus cuadrantes, donde las X indican la forma de conteo (tomado de Deane; Morlearty y Thomaz, 1984).

### **III.3. Inducción y Evaluación del Proceso de Metacicloogénesis.**

**III.3.1. Inducción de metacicloogénesis.** Los epimastigotes obtenidos a partir de los subcultivos en medio LIT (25  $\mu$ g de hemina), se tomaron al séptimo u octavo día de cultivo y se sometieron a los diferentes medios inductores de metacicloogénesis. Para hacer el pase de un medio primero se lavaron dos veces con el medio sin complementar, por centrifugación a 2500 rpm, durante 10 min; para el medio LIT con las dos concentraciones de hemina, no fue necesario lavar. Enseguida se ajustó el número de parásitos a una concentración de  $5 \times 10^8$  parásitos/ml en los diferentes medios. Finalmente se cultivaron por un periodo de 20 días a 28°C, en botellas de 25 cm<sup>2</sup> de superficie y una capacidad de 50 ml (COSTAR). Se cuantificó la metacicloogénesis cada tercer día.

**III.3.2. Evaluación de metacicloogénesis.** Debido a que la etapa de trípomastigote es resistente a la acción del complemento, se evaluó la inducción de metacicloogénesis, sometiendo muestras de las diferentes cepas a la prueba de resistencia a la lisis por complemento de las formas trípomastigotas como ha sido reportado por Nogueira, Blanco y Cohn (1975) y Contreras y colaboradores (1985) con ligeras modificaciones. La obtención de la fuente de complemento fue a partir de cobayos, (Hartley de 120 días y de 450g) a los cuales se les realizó punción

cardiaca; la sangre obtenida por este método en condiciones estériles, fue centrifugada dos veces a 2500 rpm, durante 30 min para la eliminación de los constituyentes celulares y dejar solamente al suero, que se utilizó en el momento o se guardó en alícuotas a  $-70^{\circ}\text{C}$  hasta su uso.

En la evaluación de la acción del complemento se tomaron por cuadruplicado 50  $\mu\text{l}$  de suspensión de parásitos, con un total de  $5 \times 10^5$  parásitos y se depositaron en tubos eppendorf para microcentrífuga, a los dos primeros tubos se les agregó 50  $\mu\text{l}$  de suero de cobayo fresco (o mantenido a  $-70^{\circ}\text{C}$ ) y a los dos restantes se les agregó 50  $\mu\text{l}$  de suero de cobayo inactivado a  $56^{\circ}\text{C}$  durante 30 min, (muestras controles), después se resuspendió y se incubaron a  $28^{\circ}\text{C}$  durante 1 h.

Transcurrido el período de incubación, se tomaron alícuotas y se depositaron en la cámara de Neubauer para enseguida realizar observaciones al microscopio (objetivo 40X) y determinar el porcentaje de sobrevivencia, considerándose la morfología y el movimiento del parásito. Todos los experimentos se realizaron por triplicado. La metodología fue la misma para todas las cepas probadas en los distintos medios de cultivo. La evaluación se realizó cada tercer día durante un período de 20 días.

#### III.4. Evaluación de la Virulencia por Método Enzimático.

Para la evaluación de la virulencia por diferentes cepas de *T. cruzi* se empleó el método colorimétrico descrito por Landegren (1984), y que fue utilizado por Alcina y Fresno (1987 a) para medir la infección por *T. cruzi*. Este método se basó en la presencia de la enzima lisosomal N-acetil-β-D-hexosaminidasa (2 acetamido-2-deoxi-β-D-glúcido acetamidodeoxuglucohydrolasa, EC3.2.1.30) en células de mamífero y su ausencia en *T. cruzi*. Este ensayo se realizó con dos diferentes líneas celulares, los macrófagos P388 y las células Vero. Se formaron monocapas celulares de la siguiente manera: las células se incubaron por 24 h en placas de 96 pozos (COSTAR), tomándose en total  $10 \times 10^3$  células por cada pozo y un volumen de 200 μl de medio D-MEM, para células Vero y 200 μl de medio RPMI, para células P388 (por triplicado), después las células se pusieron en contacto con los parásitos [en una proporción 1:10 (10 tripomastigotes por cada célula a infectar, no considerándose la forma de epimastigote)], previamente lavados dos veces con el medio en el que se cultivó la célula a infectar. Se dejaron en contacto 48 h para la infección, después se lavaron tres veces con medio y se incubaron por periodos de 5 y 24 h postinfección a 37°C, con CO<sub>2</sub> y 95% de humedad. Para medir la virulencia se evaluó el % de células vivas después de los respectivos tiempos de postinfección, por medio del ensayo de hexosaminidasa. Primero se lavó en tres

ocasiones cada placa con PBS, enseguida se preparó el sustrato P-nitrofenol -N-acetil - $\beta$ -glucosaminida (7.5mM) disuelto en un buffer de citratos 0.1M, pH 5.0 y se mezcló en un mismo volumen de una solución de Tritón X-100 al 0.5%; de esta mezcla se tomaron 60 $\mu$ l y se agregaron a cada pozo que contenía las células infectadas. Después se incubaron a 37°C durante 2 h, y se detuvo la reacción agregando 90 $\mu$ l de una solución Tris-glicina 50 mM, con EDTA 5 mM y pH 10.4. Se leyó la absorbancia a 405 nm en un espectrofotómetro Bio-Rad Modelo 3550 (Microplate reader).

### **III.5. Evaluación de la Infección por Método Microscópico.**

Para evaluar no solo muerte celular (o virulencia), que es el dato que nos proporciona la técnica enzimática, sino también poder hacer una evaluación de la infectividad y multiplicación de amastigotes se empleó el método microscópico.

**III.5.1. Preparación de cubreobjetos.** Para hacer una observación directa de la infección de las dos líneas celulares por T. cruzi fue necesario hacer una serie de lavados a cubreobjetos de 9mm de diámetro, con la finalidad de mejorar la adhesión

de las dos diferentes líneas celulares (P388 y Vero), de la siguiente manera: los cubreobjetos se mantuvieron en alcohol al 70% durante más de 18h, después se realizaron 10 lavados con agua corriente y luego se les agregó HCl 1N y se pusieron en agitación constante durante 30 min, enseguida se lavaron 10 veces con agua corriente y se les agregó PBS pH 7.2, dejándose en agitación constante durante 30 min, después se volvió a lavar 10 veces con agua corriente y finalmente se realizó un lavado con agua libre de pirogénos (estéril). Por cada caja de Petri de 100 x 15 mm, se colocaron cinco cubreobjetos y se esterilizaron a 120° C y 1 atmósfera de presión, durante 30 min.

**III.5.2. Infección celular.** Se formaron monocapas de células P388 y Vero en los cubreobjetos (preparados con anterioridad) en una concentración de  $5 \times 10^4$  cels/ml de medio RPMI o D-MEM (10 ml) según el tipo celular de que se tratara. Una vez que se formó la monocapa celular se pusieron en contacto durante 48h (a 37°C y 5% CO<sub>2</sub>) con las Cepas Z10, H5 (mexicanas) y CL (brasileña) de T. cruzi en una proporción 1:10 (10 tripomastigotes, por cada célula a infectar). Posteriormente se lavaron tres veces, con medio sin complementar para después agregársele nuevo medio complementado y evaluarse la infectividad de cada cepa a las 5 h postinfección, mediante la tinción de los cubreobjetos con la técnica de May



Grunwald-Giemsa; para la elaboración de esta técnica primero los cubreobjetos se dejaron secar al aire y después se fijaron con metanol (hasta secarse), enseguida se les agregó Eosinato de azul de metileno (100 mg por cada 50 ml de alcohol metílico) 5 min y luego se sumergieron en colorante de Giemsa (solución de trabajo. Apéndice II) durante 30 min. Finalmente se lavaron con agua corriente y se dejaron secar al aire para revisar la infección de las diferentes líneas celulares por T. cruzi al microscopio óptico.

**III.5.3. Cuantificación de la infección por T. cruzi.** Los cubreobjetos teñidos fueron observados a través de un microscopio óptico (American Optical) empleando el objetivo 100 X con aceite de inmersión. La infección se evaluó mediante la revisión de por lo menos 200 células en cada preparación, en estas células se determinaron dos parámetros: primero se contó el número de células infectadas y después se cuantificó el número de amastigotes intracelulares, para enseguida calcular el % de células infectadas y el número de amastigotes por célula infectada. Los diferentes campos enfocados fueron fotografiados empleando la cámara anexa al microscopio.

### **III.6. Análisis Estadístico.**

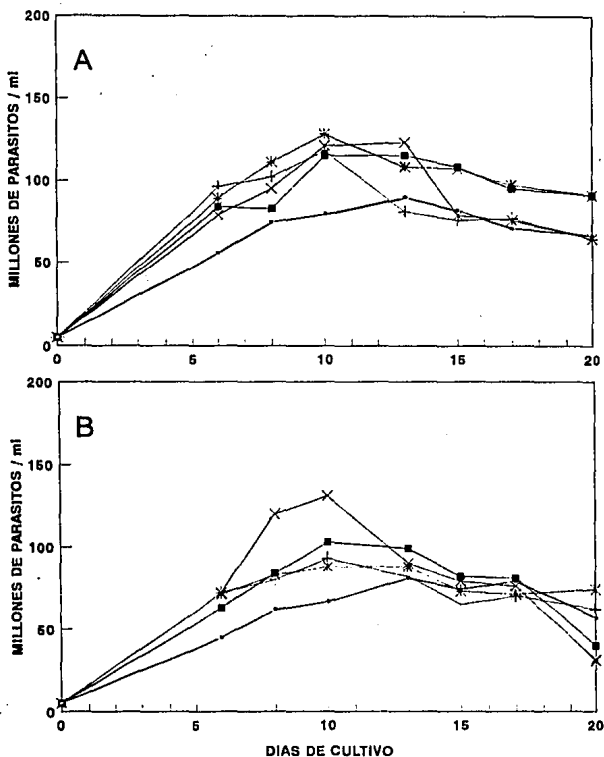
Los datos obtenidos fueron sometidos a un análisis estadístico utilizando la prueba de T-Student.

## IV. RESULTADOS.

Una gran variedad de medios de cultivo se han empleado en el cultivo de *T. cruzi*, de entre estos medios se escogieron tres, los cuales han mostrado tener los requerimientos necesarios para soportar crecimiento e inducir la transformación a la fase infectiva de dicho parásito.

### IV.1. Crecimiento de *T. cruzi* en Diferentes Medios de Cultivo.

Para evaluar el crecimiento de cepas mexicanas de *T. cruzi* in vitro se probaron cuatro cepas mexicanas (Z21, H1, C4 y Ninoa) y una clona sudamericana de referencia (Silvio X10). El primer medio en que se cultivaron las cepas fue el medio LIT, con dos concentraciones de hemina: 25  $\mu\text{g/ml}$  (concentración de uso normal) y 50  $\mu\text{g}$  de hemina/ml; las cepas cultivadas en medio LIT con 25  $\mu\text{g}$  de hemina/ml mostraron pequeñas diferencias en cuanto a su crecimiento (Fig. 5A), siendo únicamente las cepas Ninoa y Z21 las que presentaron diferencias significativas ( $p = 0.001$ ) al comparar sus valores promedio de crecimiento en el día de máximo crecimiento (día 10 de cultivo). Todas las cepas cultivadas con 50  $\mu\text{g}$  de hemina (Fig. 5B) tuvieron un comportamiento semejante a la concentración de 25  $\mu\text{g}$  de



**FIG 5. CURVAS DE CRECIMIENTO DE DIFERENTES CEPAS MEXICANAS CULTIVADAS EN MEDIO LIT.** Los parásitos fueron cultivados con (A) 25  $\mu$ g y (B) 50  $\mu$ g de hemina a 28°C, con un inóculo inicial de  $5 \times 10^9$  parásitos/ml. El crecimiento fue analizado al microscopio óptico con un objetivo 40x y los valores en cada punto representan los promedios de tres experimentos. Los valores de crecimiento de las cepas mexicanas, se compararon con los valores de crecimiento de la clona de referencia, Silvio X10 (brasileña).

hemina/ml, ya que no existieron diferencias entre ellas. Al comparar los valores de crecimiento del parásito en las dos concentraciones de hemina (Tabla II) se observó que sólo la cepa Ninoa mostró diferencias ( $p = 0.02$ ) significativas, presentando un mejor crecimiento en medio LIT con  $25 \mu\text{g}$  de hemina/ml. El segundo medio en el que fueron cultivados los parásitos, el medio TAUP, no permitió el crecimiento de las cepas. El tercer medio empleado para cultivar a las diferentes cepas fue el medio Grace, el cual sí permitió el crecimiento (Tabla II) de las cepas, no obstante se observaron diferencias. Al comparar el crecimiento de las cepas en medio Grace, con respecto al medio LIT con  $25$  y  $50 \mu\text{g}$  de hemina/ml (Tabla II), se encontró que el crecimiento fue menor para las cepas H1, Ninoa y la clona Silvio X10 ( $p \geq 0.02$ ) cultivadas en medio Grace.

#### **IV.1.1. Diferencias de crecimiento de cepas mexicanas en medio Grace.**

A pesar de que en algunas cepas no se observó que el medio Grace fuera el medio más favorable para el crecimiento, se hizo uso de él para llevar a cabo la caracterización de las restantes cepas (16 cepas y una clona; Tabla III), debido a que este medio fue el único que en nuestras condiciones indujo metacicloogénesis (ver más adelante). Para efectuar la comparación de crecimiento, se agruparon de acuerdo a su procedencia geográfica, dado que se tenía el antecedente de que el

**TABLA II. COMPARACION DE CRECIMIENTO DE *T. cruzi* EN DIFERENTES MEDIOS DE CULTIVO.**

CEPA	MEDIO LIT		MEDIO GRACE
	25 µg de hemina/ml.	50 µg de hemina/ml.	
C4	128 ± 24	88 ± 18	69 ± 11
NINOA	115 ± 7	103 ± 4	67 ± 17
H1	118 ± 21	93 ± 8	64 ± 15
Z21	90 ± 2	81 ± 20	84 ± 23
SILVIO X10	123 ± 21	131 ± 38	75 ± 2

Esta tabla muestra los valores obtenidos en el día de máximo crecimiento de *T. cruzi* expresado en millones de parásitos/ml, obtenidos a partir del cultivo en diferentes medios. Los valores representan el promedio de 3 experimentos ± su desviación estándar (SD).

DNA total de las diferentes cepas presentaba patrones determinados de acuerdo al lugar de procedencia de cada cepa. De esta manera se agruparon en cepas de la península de Yucatán, de la zona central y sudamericanas (Tabla III). Las cepas provenientes de Yucatán (Tabla III) presentaron un crecimiento variable entre ellas, de  $37 \times 10^6$  a  $84 \times 10^6$  parásitos/ml, al aplicar la prueba estadística se encontró que hubo diferencias significativas al comparar la cepa H4, que fue la cepa que presentó los valores más bajos de crecimiento con respecto a las cepas que más crecieron, H5, H9, HG y Z21 ( $p \geq 0.001$ ). Las cepas de la zona central (Tabla III) que incluyeron a las cepas de los estados de Oaxaca, Zacatecas, Morelos y Jalisco presentaron valores de crecimiento de  $46 \times 10^6$  a  $69 \times 10^6$  parásitos/ml, no observándose diferencias significativas entre ellas. En lo que respecta a las cepas sudamericanas (Tabla III) se encontró que al igual que las cepas mexicanas, éstas presentaron heterogeneidad en cuanto a su crecimiento con valores de  $45 \times 10^6$  a  $75 \times 10^6$  parásitos/ml, encontrándose solamente diferencias significativas entre la clona Silvio X10, que fue la que creció más, con respecto a las restantes cepas que crecieron menos: CL, Perú y la clona Esmeraldo ( $p \geq 0.001$ ). No obstante tales resultados, al llevar a cabo las comparaciones entre los los valores de crecimiento de los tres grupos de cepas, se pudo observar que éstos no varían en la mayoría de los casos; únicamente fueron significativamente diferentes, los casos arriba señalados.

TABLA III. COMPARACION DE CRECIMIENTO Y METACICLOGENESIS ENTRE DIFERENTES CEPAS DE *T. cruzi*

CEPA	CRECIMIENTO EN MEDIO GRACE (millones de parásitos/ml) <sup>a</sup>	METACICLOGENESIS EN MEDIO GRACE (%) <sup>b</sup>
NOMBRE		
C4 (JALISCO)	69 ± 11	27 ± 17
EA (MORELOS)	46 ± 12	1 ± 1
ZACATECAS	48 ± 5	22 ± 2
CID (OAXACA)	69 ± 16	28 ± 7
FRV (OAXACA)	47 ± 7	15 ± 10
NINOA (OAXACA)	67 ± 17	28 ± 6
H1 (YUCATAN)	64 ± 15	7 ± 6
H3 (YUCATAN)	52 ± 11	22 ± 4
H4 (YUCATAN)	37 ± 2	5 ± 7
H5 (YUCATAN)	46 ± 4	26 ± 7
H9 (YUCATAN)	59 ± 5	7 ± 5
H10 (YUCATAN)	38 ± 6	5 ± 3
HG (YUCATAN)	51 ± 8	9 ± 4
T (YUCATAN)	48 ± 12	16 ± 2
Z10 (YUCATAN)	51 ± 9	39 ± 10
Z17 (YUCATAN)	43 ± 10	8 ± 4
Z21 (YUCATAN)	84 ± 27	41 ± 8
CL (BRASIL)	50 ± 3	66 ± 8
Y (BRASIL)	67 ± 13	57 ± 7
SILVIO X10 (BRASIL)	75 ± 2	2 ± 2
ESMERALDO (BRASIL)	45 ± 6	60 ± 3
PERU	50 ± 11	36 ± 10

a. Muestra promedios del día máximo de crecimiento ± SD.

b. Muestra promedios del día máximo de metaciclogénesis ± SD.

En los dos casos se efectuaron tres experimentos para cada cepa estudiada. Se analizaron 17 cepas mexicanas y cinco cepas sudamericanas en sus propiedades de crecimiento y metaciclogénesis en medio Grace.



**TABLA IV. COMPARACION DE METACICLOGENESIS DE *T. cruzi* EN DIFERENTES MEDIOS DE CULTIVO.**

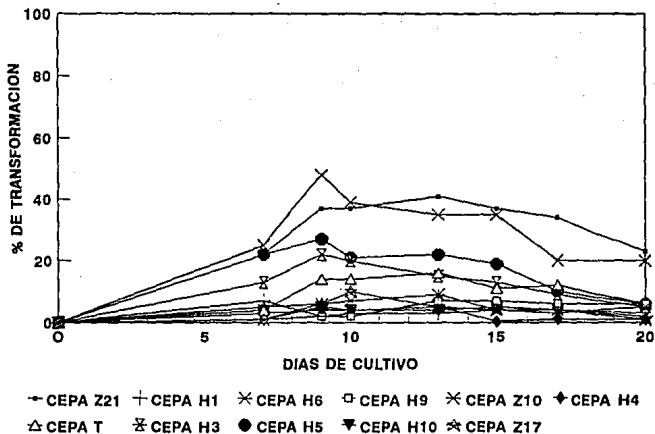
CEPA	MEDIO LIT		MEDIO TAUP	MEDIO GRACE
NOMBRE	25 $\mu$ g/ml de hemina.	50 $\mu$ g/ml de hemina.	10 mM L-prolina.	
C4	5 $\pm$ 4	4 $\pm$ 5	1 $\pm$ 1	27 $\pm$ 17
NINOA	17 $\pm$ 11	0	2 $\pm$ 3	28 $\pm$ 6
H1	4 $\pm$ 5	0	0	7 $\pm$ 6
Z21	18 $\pm$ 20	3 $\pm$ 4	8 $\pm$ 4	41 $\pm$ 8
SILVIO X10	2 $\pm$ 2	0	1 $\pm$ 1	2 $\pm$ 2

La tabla muestra promedios de tres experimentos  $\pm$  SD del día máximo de metaciclogénesis (definida como % de la población que se volvió resistente al complemento), obtenidos como resultado del cultivo de *T. cruzi* en distintos medios.

#### IV.2. Inducción de Metacicloogénesis en T. cruzi.

Para la inducción de metacicloogénesis en las cepas mexicanas se probaron los mismos tres medios ya mencionados con anterioridad y las mismas cinco cepas que se probaron para la caracterización de crecimiento; el medio LIT con dos concentraciones de hemina 25 y 50  $\mu\text{g/ml}$ ; el medio TAUP y el medio Grace. El primer medio con las dos diferentes concentraciones de hemina, indujo niveles bajos de metacicloogénesis en la población de parásitos (Tabla IV). Al realizar la comparación estadística entre el medio LIT con las diferentes concentraciones de hemina, se reveló que efectivamente no había diferencias significativas entre los valores de metacicloogénesis de las cepas. El medio TAUP también indujo porcentajes bajos de metacicloogénesis (Tabla IV), ya que el máximo porcentaje obtenido fue de 8%, para la cepa Z21. El tercer medio, el medio Grace provocó mayor metacicloogénesis (Tabla IV) con respecto al medio LIT y TAUP, pues para la cepa C4 hubo una inducción de metacicloogénesis de 27%, para la cepa Ninoa un 28% y para la cepa Z21 un 41%.

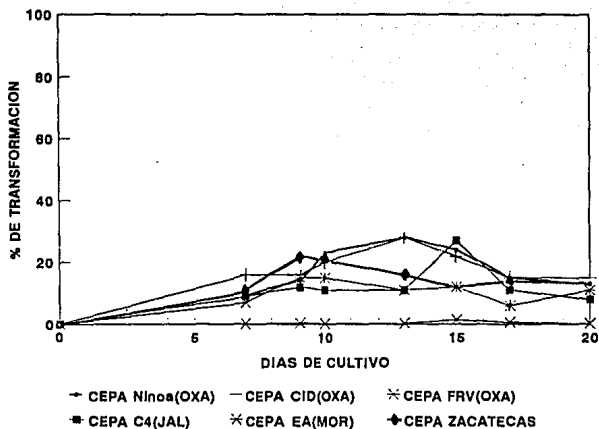
Dado que el mejor inductor de metacicloogénesis fue el medio Grace, se decidió probar dicho medio con todas las cepas mexicanas de T. cruzi. Las cepas se agruparon por regiones geográficas (Tabla III), y los resultados demostraron una gran heterogeneidad. Las cepas del estado de Yucatán (Fig. 6 y Tabla III)



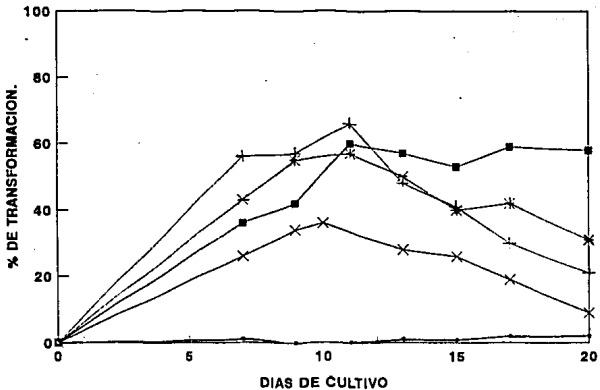
**FIG 6. CINÉTICA DE METACICLOGÉNESIS DE CEPAS DE LA PENÍNSULA DE YUCATÁN.** Las cepas fueron cultivadas en medio Grace a 28°C, con un inóculo inicial de  $5 \times 10^6$  parásitos/ml. La metaciclogénesis se evaluó por medio de resistencia a la lisis por complemento de los tripomastigotes, empleando suero de cobayo fresco o almacenado a -70°C. Los parásitos se incubaron junto con el complemento durante 1 h, y se contó el número de parásitos que sobrevivieron a la acción del complemento, utilizando la cámara de Neubauer. Las cinéticas de transformación se realizaron por triplicado y por conveniencia se graficó solamente el promedio.

presentaron una inducción máxima de metaciclógenésis en las cepas Z21 y Z10, de 41 y 39% respectivamente; las cepas T, H3, y H5 tuvieron valores de metaciclógenésis intermedios, es decir de 16 a 26%, mientras que las cepas H1, H4, H9, H10, HG y Z17 mostraron los porcentajes más bajos de metaciclógenésis, de 5 a 9%; sometiendo los valores de metaciclógenésis obtenidos por las cepas que más se transformaron y las cepas que menos se transformaron a la prueba estadística se encontró que sí hay diferencias significativas ( $p \geq 0.001$ ) entre las cepas de esta región geográfica.

Las cepas de la zona centro (Fig. 7 y Tabla III) que abarcan distintos estados presentaron también valores de metaciclógenésis variables, así las cepas del estado de Oaxaca, FRV, CID y Ninoa presentaron porcentajes de metaciclógenésis de 15 al 28%; la cepa del estado de Jalisco, C4, presentó un 27% de metaciclógenésis; la cepa del estado de Zacatecas, Zacatecas, presentó un 22% de metaciclógenésis; la cepa del estado de Morelos, EA, prácticamente no se transformó, ya que tuvo un porcentaje bajo de metaciclógenésis, de 1%. Al aplicar la prueba estadística hubo diferencias significativas ( $p = 0.001$ ) entre la cepa que menos se transformó EA y las cepas que más se transformaron Zacatecas, CID y Ninoa. Finalmente la metaciclógenésis en las cepas sudamericanas (Fig.8 y Tabla III) al igual que en las cepas mexicanas mostraron diferencias; las cepas con mayores porcentajes de metaciclógenésis fueron: CL, Y, y la clona Esmeraldo con 66, 57 y 60%



**FIG 7. CINÉTICA DE METACICLOGÉNESIS DE CEPAS DE LA ZONA CENTRAL DE MÉXICO.** Las cepas se cultivaron en medio Grace a 28°C, con un inóculo inicial de  $5 \times 10^6$  parásitos/ml. La metaciclogénesis fue evaluada como se describió en la fig.6. Los experimentos fueron realizados por triplicado y se graficó sólo el promedio.



△ CLONA SILVIO(B) + CEPa CL(B) \* CEPa Y(B) ■ CLONA ESMERALDO(B) × CEPa PERU(P)

**FIG 8. CINÉTICA DE METACICLOGÉNESIS DE CEPAS SUDAMERICANAS.** Las cepas sudamericanas se sometieron a las mismas condiciones que las cepas mexicanas. Los experimentos se realizaron por triplicado.

respectivamente, por otro lado la cepa Perú tuvo un 36% de metaciclógenesis, mientras que la clona Silvio X10 presentó el porcentaje más bajo de metaciclógenesis de 2%. El porcentaje de metaciclógenesis de la clona Silvio X10 que menos se transformó comparado con las cepas que más se transformaron CL, Y, Perú y la clona Esmeraldo, resultaron significativamente diferentes ( $p = 0.001$ ). En general las cepas sudamericanas presentaron valores mayores de metaciclógenesis in vitro que las cepas mexicanas.

#### **IV.3. Infectividad de T. cruzi Sobre Células Fagocíticas y no Fagocíticas.**

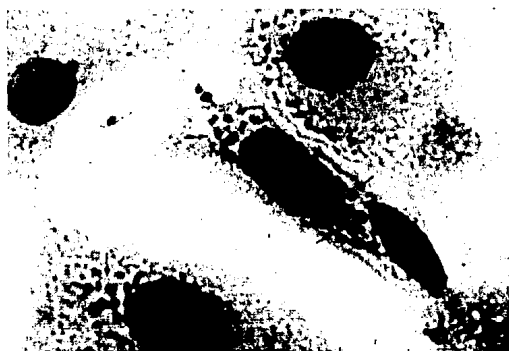
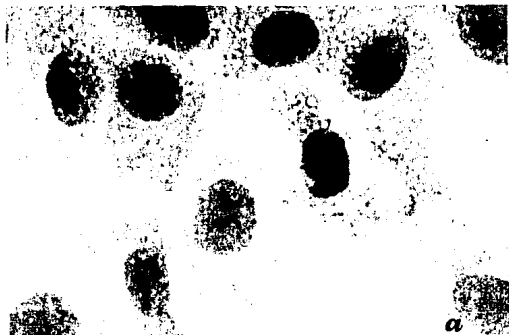
La infección y virulencia de un parásito puede ser diferente para células fagocíticas y no fagocíticas, y aún para un mismo tipo de célula, pudiendo estar dadas estas diferencias por la variabilidad de las características de las cepas tanto a nivel morfológico como genético, además de otras características; por otro lado la fase de crecimiento en que se encuentre la célula hospedera será importante en el mayor o menor éxito de penetración.

Para evaluar la infección se emplearon tres cepas de T. cruzi, dos mexicanas Z10 y H5, y una sudamericana, CL. Las cepas Z10, H5, y CL fueron escogidas por ser



**FIG 9. INFECCIÓN DE MACRÓFAGOS P388 POR *T. cruzi* (100X).** Se muestra la infección ocasionada por tripomastigotes de la cepa yucateca Z10 a macrófagos P388 (b), comparándose con el control sin infectar (a). La evaluación de la infección fue mediante el conteo de células con amastigotes intracelulares (flechas →). Se empleó tinción de May Grunwald-Giemsa.





**FIG 10. INFECCIÓN DE CÉLULAS VERO POR *T. cruzi* (100X).** Se muestra la infección ocasionada por tripomastigotes de la cepa yucateca Z10 a células Vero (b), comparándose con el control sin infectar (a). La evaluación de la infección fue mediante el conteo de células con amastigotes intracelulares (flechas →). Se empleó tinción de May Grunwald-Giemsa.

**TABLA V. COMPARACION DEL PODER INFECTIVO DE DISTINTAS CEPAS DE *T. cruzi* EN DIFERENTES LINEAS CELULARES.**

CEPA DE <i>T. cruzi</i>	LINEA DE CELULAS INFECTADAS	% DE INFECCION CELULAR <sup>a</sup>	NUMERO DE AMASTIGOTES/ 100 CELULAS <sup>b</sup>
Z10	P388	60 ± 13	337 ± 33
CL		44 ± 18	353 ± 124
H5		17 ± 4	193 ± 17
Z10	VERO	83 ± 1	483 ± 56
CL		69 ± 5	333 ± 72
H5		15 ± 4	146 ± 15

En esta tabla se muestra el % de células infectadas (a) con tripomastigotes de tres cepas de *T. cruzi*, después de 5 h postinfección, determinándose mediante el conteo de células con amastigotes intracelulares. El número de amastigotes (b) de la cepas Z10, H5 y CL, se cuantificó por cada 100 células P388 y Vero infectadas.

las cepas que presentaron los valores más altos de metaciclologénesis. Las células que se usaron para la infección fueron la línea de macrófagos P388 y la línea de células epiteliales, Vero. Al poner a cultivar las células fagocíticas, línea de macrófagos P388 (Fig. 9a) y las células no fagocíticas, Vero (Fig. 10a) con las distintas cepas de *T. cruzi*, se observó un mayor porcentaje de infección tanto de células P388 como de células Vero (Fig. 9b y 10b) por la cepa Z10; la cepa H5 que presentó un bajo porcentaje de metaciclologénesis (con respecto a Z10 y CL), infectó a menor cantidad de células, tanto de la línea P388 como de las células Vero. Sin embargo estadísticamente, al comparar el poder infectivo de las cepas sobre los macrófagos (Tabla V) se encontró que solamente presentaron diferencias significativas, la cepa H5 con respecto a la cepa Z10 ( $p = 0.01$ ); en tanto que en células Vero (Tabla V), la cepa H5 fue diferente con respecto a Z10 y CL, y a su vez estas últimas cepas también fueron diferentes en su capacidad infectiva ( $p = 0.001$ ). Al comparar los porcentajes de infección de las mismas cepas, con las distintas líneas celulares se encontraron diferencias significativas ( $p = 0.001$ ) en la cepa Z10, infectando mejor a las células Vero que a los macrófagos P388. De estos resultados se pudo observar también que el poder infectivo de las cepas mexicanas analizadas pudo igualar o superar al poder infectivo de la cepa sudamericana *in vitro*. El número de amastigotes (Tabla V) intracelulares fue proporcional al poder infectivo de la cepa utilizada; observándose además que la

cepa Z10 se reproduce mejor dentro células Vero a diferencia de las cepas CL y H5.

#### **IV.4. Virulencia de I. cruzi Sobre Células Fagocíticas y no Fagocíticas.**

Para determinar virulencia, se contó con 12 cepas de I. cruzi; ocho cepas mexicanas pertenecientes a la península de Yucatán y zona central, y cuatro cepas sudamericanas que se tomaron de referencia para evaluar el poder virulento sobre la línea P388 y la línea Vero. Se estudiaron estas cepas de I. cruzi por ser las cepas que presentaron los porcentajes más altos de metacicloogénesis. La evaluación de virulencia o muerte celular se realizó mediante el ensayo colorimétrico que mide la liberación de la enzima hexosaminidasa en células vivas y por diferencia en la lectura con respecto a células control no infectadas, se infirió el porcentaje de células muertas a diferentes tiempos postinfección 5 y 24 h. Las cepas mostraron diferentes capacidades de virulencia (Tabla VI) sobre las dos líneas celulares ya que los macrófagos resultaron ser más sensibles al parásito, pues a las 5 h postinfección, los valores de muerte de los macrófagos P388 fueron más altos (de 17 a 68%) que en las células Vero (de 7 a 36%), estas observaciones fueron

TABLA VI. VIRULENCIA DE DIFERENTES CEPAS DE *T. cruzi* "IN VITRO".

CEPA DE <i>T. cruzi</i>	LINEA CELULAR	5 h POSTINFECCION	24 h POSTINFECCION
C4	P388	68 ± 6 *	69 ± 13
ZACATECAS		39 ± 9 *	63 ± 11
CID		41 ± 21 *	39 ± 18
NINOA		43 ± 24	43 ± 54
H3		60 ± 9 *	67 ± 8
H5		64 ± 7 *	64 ± 13
Z10		27 ± 11	10 ± 2
Z21		59 ± 6 *	58 ± 13
CL		35 ± 12	35 ± 25
Y		17 ± 16	15 ± 3
ESMERALDO		70 ± 5 *	76 ± 15
PERU		36 ± 15	36 ± 19
C4	VERO	23 ± 8 *	34 ± 20
ZACATECAS		20 ± 5 *	28 ± 14
CID		7 ± 3 *	20 ± 13
NINOA		8 ± 15	11 ± 21
H3		18 ± 5 *	21 ± 17
H5		18 ± 5 *	28 ± 14
Z10		26 ± 10	22 ± 10
Z21		19 ± 12 *	25 ± 11
CL		36 ± 4	28 ± 10
Y		17 ± 13	20 ± 10
ESMERALDO		29 ± 13 *	38 ± 14
PERU		28 ± 12	26 ± 5

La tabla muestra el % de muerte (promedios de tres experimentos ± SD) de diferentes líneas celulares por *T. cruzi*, evaluado por un método colorimétrico que cuantificó el contenido de hexosaminidasa en células vivas (lectura a 405 nm). Por la diferencia de la lectura con respecto a células control no infectadas se pudo inferir el % de células muertas, revelando con ello, el poder virulento de las diferentes cepas de *T. cruzi*.

confirmadas al aplicar la prueba estadística, comparando la virulencia de la misma cepa de T. cruzi en las dos líneas (P388 y Vero), ya que hubo diferencias significativas (\*  $p \geq 0.001$ ) en las cepas C4, Zacatecas, Esmeraldo, pues destruyeron al doble de macrófagos que de células Vero; en tanto que las cepas H3, H5, Z21, causaron la muerte de tres veces más macrófagos con respecto a las células Vero. También se observó que la virulencia de las cepas de T. cruzi sobre las células P388 y Vero, a las 24 h postinfección se conservó.

## V. DISCUSION.

Los resultados obtenidos al evaluar las características biológicas de crecimiento, metacicloogénesis, infectividad y virulencia de las cepas mexicanas de T. cruzi in vitro mostraron grandes diferencias entre las distintas cepas mexicanas. El crecimiento de las cepas cultivadas en los diferentes medios presentó variaciones en cuanto al número de parásitos/ml. El medio LIT suplementado con 25  $\mu\text{g}$  de hemina/ml (concentración de uso normal en cultivo), permitió el crecimiento del estadio replicativo, epimastigote, de las cinco cepas analizadas. Sin embargo, al aumentar la concentración de hemina a 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , no se observó ningun efecto en el crecimiento ni en la inducción de metacicloogénesis, difiriendo tales resultados con los datos reportados por Arévalos Panebra y Santa Cruz (1985), y Vargas (1992). Estos autores reportaron que la hemina (fuente de fierro en cultivo) es un constituyente importante en los procesos de replicación celular y metacicloogénesis, es decir a mayor concentración de hemina mayor inducción de crecimiento y metacicloogénesis. Las concentraciones de hemina usadas por Arévalos y colaboradores fueron de 0 a 20  $\mu\text{g}$  de hemina/ml, con la concentración más alta de hemina se obtuvo una inducción de metacicloogénesis de alrededor del 80% en la cepa sudamericana AWP. Por otro lado, Vargas en 1992, mostró un aumento en

la inducción de crecimiento y metacicloogénesis en dos cepas mexicanas, C4 y H4. El valor máximo de metacicloogénesis para la cepa C4 fue de 47%, con la concentración de 50  $\mu$ g de hemina/ml. En cambio, en el presente estudio la cepa C4, sólo mostró un 4% de metacicloogénesis. Esta diferencia en resultados se puede deber a que la fuente de complemento empleada para evaluar la transformación fue distinta en los dos estudios. En el estudio de Vargas se utilizó suero humano y en el presente trabajo se empleó suero de cobayo. De estas observaciones se desprende que, al igual que se ha visto en cepas sudamericanas, no todas las cepas mexicanas responden igual a los diferentes estímulos.

El medio TAUP, tampoco indujo metacicloogénesis en las cepas mexicanas. Esto a pesar de que Contreras y colaboradores (1985), Homsy, Granger y Krassner (1989), y Krassner y colaboradores (1990 y 1991) han reportado que este medio provoca la transformación a tripomastigote en T. cruzi. La inducción también dependió de la cepa de que se tratase pues Contreras y colaboradores (1985), obtuvieron una inducción de metacicloogénesis de 4 a 87% al cultivar diferentes cepas en medio TAUP, dichos valores se incrementaron al hacer pases de los parásitos por diferentes medios, es decir al pasar los parásitos de medio TAUP a medio LIT, para después ser cultivados nuevamente en medio TAUP. En los trabajos reportados por Homsy, Granger y Krassner (1989) y Krassner y colaboradores (1990 y 1991) utilizaron el mismo medio pero modificaron las condiciones de



cultivo de los parásitos, ya que gasearon los cultivos con 5% de CO<sub>2</sub>, lo que aumentó los porcentajes de metacicloogénesis en los parásitos. A pesar de estas observaciones, se encontró que las cepas mexicanas cultivadas en medio TAUP, no responden al estímulo de estrés nutricional ni al aminoácido L-prolina, aunque en este caso no se gasearon los cultivos ni se cultivaron de nueva cuenta en medio TAUP. Se puede sugerir que los resultados observados en la presente tesis, se debieron al tipo de cepas que fueron cultivadas en tal medio y no a las condiciones de cultivo. Esto se confirmó al emplear el medio Grace, el cual mostró una mayor capacidad de inducción de metacicloogénesis, pero un menor soporte de crecimiento comparado con el medio LIT. Esto último, resulta lógico, ya que el medio Grace indujo la transformación a tripomastigotes (forma no replicativa), por lo cual bajan los niveles de crecimiento. Por otro lado, el crecimiento de las diferentes cepas en medio Grace, no mostró grandes diferencias, ya que únicamente se presentaron variaciones entre la cepas yucateca, H4 que fue la cepa que creció menos, con respecto a las cepas que crecieron más H5, H9, HG y Z21; en tanto que en las cepas sudamericanas, sólo fue diferente la clona Silvio X10 que presentó el valor más alto de crecimiento, con respecto a las cepas que crecieron menos, CL, Perú y la clona Esmeraldo.

Como se ha visto el medio Grace fue el mejor inductor de metacicloogénesis, sin embargo no se sabe a través de que mecanismo se activa tal fenómeno. Este medio

es más completo que los medios LIT y TAUP, está constituido por sales orgánicas, vitaminas, y aminoácidos, incluyendo a la L-prolina que se piensa interviene como fuente de energía necesaria para la metaciclógenésis. Su fórmula semeja a la hemolinfa del insecto Antheraea eucalypti (Grace, 1962) y se ha usado en el cultivo de tejidos de insecto, quizá estos constituyentes puedan disparar algún mecanismo que logre inducir el fenómeno de metaciclógenésis. De estas observaciones se puede pensar que además de los posibles factores inductores de metaciclógenésis en los medios probados, las características propias de cada cepa tienen mucho que ver, pues no obstante que el medio Grace mostró ser un buen inductor de metaciclógenésis no todas las cepas respondieron de la misma manera, encontrándose mayor inducción de metaciclógenésis en las cepas yucatecas Z10 y Z21 con un 39 y 41% respectivamente, y una menor inducción en las cepas H1, H3, H9, H10, HG y Z17 con valores de 5 a 9%. En contraste, las cepas de la zona central tuvieron valores intermedios de metaciclógenésis con respecto a las cepas yucatecas que más se transformaron, así las cepas C4, Zacatecas, CID, FRV y Ninoa presentaron valores de 15 a 28% de metaciclógenésis, sólo la cepa EA del estado de Morelos presentó un 1% de metaciclógenésis, siendo la única cepa que no se comportó como las restantes. Las cepas sudamericanas tuvieron los valores más altos de metaciclógenésis, que fueron de 36 a 66%. Las variaciones que se presentaron en el fenómeno de metaciclógenésis no parecen estar dadas por el

origen del hospedero, sino por causas multifactoriales, entre ellas la variabilidad genética. En el estudio realizado por Zavala-Castro, Velasco-Castrejón y Hernández (1992) en donde se estudiaron estas mismas cepas, se observaron diferencias genéticas entre cada cepa. La comparación se hizo a nivel de fragmentos de la región espaciadora del rRNA ribosomal de *T. cruzi* y por el patrón de corte de la enzima Hinf I del DNA total. Este estudio demostró que las cepas mexicanas podían agruparse de acuerdo a la región geográfica de la que procedían, presentando un patrón característico. Sin embargo, nuestros datos de metaciclógenésis difieren de los anteriores, ya que el grupo de Yucatán que en el estudio antes mencionado mostró características comunes entre las cepas de la zona, en nuestro estudio presentó una gama amplia de capacidad de metaciclógenésis. El grupo de la región Central de México fue más homogéneo coincidiendo con lo observado por Zavala-Castro, Velasco-Castrejón y Hernández (1992), exceptuando la cepa EA. El grupo de cepas sudamericanas también fue homogéneo, sólo la clona Silvio X10, mostró diferencias, tanto en el patrón de restricción, como en la inducción de metaciclógenésis.

Otras características biológicas importantes para caracterizar a las cepas es la infección a células, que en el presente trabajo se evaluó por observación al microscopio. La infección de las células fagocíticas (P388) y células no fagocíticas

(Vero) por T. cruzi se evaluó después de haber estado en contacto parásitos y células por espacio de 48 h. Este tiempo de co-cultivo se puede considerar largo, si se compara con los tiempos generalmente usados, es decir de 1 a 5 h (Williams y Remington, 1977; Alcina y Fresno, 1987 a y b; Wirth y col., 1985; Yakubu, Basso y Kierszbaum, 1992; Yakubu, Majumder y Kierszbaum, 1993). En este trabajo fue necesario co-cultivar por 48 h, ya que en tiempos de co-cultivo menores (4, 12 y 24 h) no fue posible observar infección. Períodos más largos de incubación fueron reportados por Kipnis, Galich y Da Silva (1979), quienes observaron mayores valores de infección a macrófagos peritoneales de ratón, si el tiempo de contacto se incrementa a 24 h. Sanderson, Thomas y Twomey (1980) emplearon 48 h de interacción, utilizando cepas sudamericanas (Esmeraldo y Perú) para infectar la línea celular MRC5 (humana) y obtener tripomastigotes. Los resultados del presente trabajo demuestran que los tripomastigotes obtenidos a partir de la inducción de metacicogénesis in vitro, mediante el medio Grace, fueron realmente infectivos tanto en células fagocíticas como en no fagocíticas, evaluándose tanto la infección en el momento en que se habían diferenciado de la fase de tripomastigotes a amastigotes intracelulares, así como la replicación que ocasionó la lisis celular. También se observó que la infección por T. cruzi in vitro difiere de acuerdo a la célula que va a invadir, pues la infección por la cepa Z10, fue mayor para las células epiteliales Vero (83%) que para los macrófagos P388 (60%). Una situación

parecida se observó con la cepa brasileña CL. Es importante hacer notar que, al menos in vitro la cepa Z10 fue igual de infectiva que la cepa CL, lo cual indica que algunas cepas mexicanas se pueden considerar, en cuanto a su poder infectivo in vitro, semejantes a las cepas sudamericanas.

La virulencia, definida en el actual trabajo como la capacidad para destruir células, fue evaluada por un método enzimático para cada una de las cepas mexicanas. La virulencia de las cepas probadas también fue variable tanto en cepas mexicanas como en cepas sudamericanas, sin embargo se observó que, en general las cepas fueron más virulentas para los macrófagos P388 que para células Vero, evaluada la virulencia a las 5 y 24 h postinfección. Estas observaciones no se correlacionaron con los datos obtenidos de infección de las mismas cepas, lo que hace suponer que en el fenómeno de virulencia intervienen otros factores diferentes del poder infectante de la cepa. De esto, se desprende que el ensayo de cuantificación de la liberación de la enzima Hexosaminidasa no podrá revelar que tan infectivas son las cepas a menos que sea evaluada a la par la infección por medio de tinción y de conteo de amastigotes intracelulares, así como de parásitos en el medio, como lo han realizado Alcina y Fresno (1987), para después correlacionarlo con los valores de Hexosaminidasa, sin embargo este punto también va a depender de la cepa de que se trate.

En resumen el presente trabajo reveló heterogeneidad entre todas las cepas analizadas, lo cual coincide con las observaciones de heterogeneidad presentadas en otros estudios. Los trabajos realizados por Tibayrenc y Ayala (1988), en donde se hace el análisis de diferentes aislados de I. cruzi a nivel de perfiles isoenzimáticos, revelaron variabilidad a nivel genético. Con estos hallazgos se confirma la hipótesis propuesta por ellos mismos acerca de que I. cruzi divergió y evolucionó independientemente a partir de múltiples clones. Tales resultados, así como los obtenidos en el presente estudio en donde se caracterizaron las propiedades biológicas de crecimiento, metaciclo génesis, infectividad y virulencia, tienen correspondencia con otras propiedades que revelaron también heterogeneidad como son los estudios realizados en cepas sudamericanas de I. cruzi con respecto al contenido de DNA (Dvorak, 1984); a la digestión del DNA del cinetoplasto por enzimas de restricción (citado en Snary, 1985); reconocimiento por anticuerpos monoclonales (Giovanni-De-Simone y col., 1987); cinética de crecimiento (Dvorak, Hartman y Miles, 1980), tropismo hacia determinado tejido, infectividad, patogenicidad (Giovanni-De-Simone y col., 1987); y a nivel genético, como se ha mencionado al comparar las observaciones en cepas mexicanas realizadas por Zavala-Castro, Velasco-Castrejón y Hernández (1992) y en el presente trabajo.

Se puede especular que la enfermedad de Chagas en México presenta características diferentes a la enfermedad en otras partes de latinoamerica, probablemente debido al polimorfismo a nivel genético que se refleja en el comportamiento biológico de las cepas de T. cruzi.

Finalmente es importante hacer notar que este trabajo constituye el primer paso para realizar la caracterización in vivo de las diferentes cepas mexicanas de T. cruzi. Asimismo, los resultados aquí reportados permitirán caracterizar los mecanismos de interacción de este parásito con diferentes células hospederas in vitro.

## VI. CONCLUSIONES.

- El crecimiento de las diferentes cepas de T. cruzi no se vió afectado por un incremento en la concentración de hemina (50  $\mu\text{g/ml}$ ) en el medio LIT, ya que no hubo diferencias con la concentración de uso normal (25  $\mu\text{g/ml}$ ).
- El medio LIT con sus dos diferentes concentraciones de hemina mostró ser el mejor medio que soporta la replicación celular de T. cruzi.
- La fórmula del medio empleado en el cultivo de las diferentes cepas influyó de manera importante en la inducción de metacicloogénesis. El medio Grace resultó ser un buen inductor de transformación a tripomastigote, a diferencia del medio LIT y TAUP, los cuales no indujeron tal fenómeno. También se pudo notar que las cepas de T. cruzi no responden de igual manera al cultivo en medio Grace, ya que se encontraron diferentes índices de metacicloogénesis. Los niveles más altos de transformación se presentaron en las cepas sudamericanas y en dos cepas yucatecas, mientras que en las restantes cepas los niveles fueron más bajos.

ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA



- La infección por cepas mexicanas y sudamericanas de T. cruzi fue mayor en células no fagocíticas que en células fagocíticas.
- También la virulencia de las cepas fue mayor para células fagocíticas que para células epiteliales.
- Se reveló heterogeneidad en las características de metaciclogénesis, infectividad y virulencia entre las cepas mexicanas. También se observaron diferencias en cuanto a la transformación de las cepas mexicanas con respecto a las cepas sudamericanas de referencia. Tales observaciones coincidieron con el análisis del DNA reportado con anterioridad para las mismas cepas.

## VII. BIBLIOGRAFIA.

1. Aguirre, P.E. 1946. Presencia de Trypanosoma cruzi en Mamíferos y Triatomídeos de Nuevo León, Monterrey, México. Memorias del Primer Congreso Médico-Social. Panamericano. (8): 359-363.
2. Alcina, A. y Fresno, M. 1987 a. A Colorimetric Assay Based on Cell Viability for the Indirect Detection of Intracellular Replication and Killing of Trypanosoma cruzi. J. Immunol. Meth., 105: 1-8.
3. Alcina, A. y Fresno, M. 1987 b. Activation by Synergism between Endotoxin and Lymphokines of the Mouse Macrophage Cell Line J774 Against Infection by Trypanosoma cruzi. Parasitol. Immunol., 9: 175-186.
4. Andrade, S.G., Magalhães, J.B. y Pontes, A.L. 1985. Evaluation of Chemotherapy with Benznidazole and Nifurtimox in Mice Infected with Trypanosoma cruzi Strains of Different Types. Bull. World Health Organ., 63: 721-726.
5. Andrews, N.W. y Colli, W. 1982. Adhesion and Interiorization of Trypanosoma cruzi in Mammalian Cell. J. Protozool., 29: 264-269.
6. Arévalos, J., Panebra, A. y Santa Cruz, C. 1985. Relevance of Hemin for In vitro Differentiation of Trypanosoma cruzi. J. Protozool., 32: 553-555.
7. Athías, A y Neghme, A. 1984. Parasitología Clínica. Mediterráneo. Chile. pp 238-251.
8. Avila, J.L., Bretana, A., Casanova, M.A., Avila, A. y Rodrigues, F. 1979. Trypanosoma cruzi: Defined Medium for Cultivation of Virulent Parasites. Exp. Parasitol., 48: 27-35.
9. Ayala, A. y Kierszenbaum, F. 1987. The Effects of p-chloromercuriphenylsulfonic Acid on Trypanosoma cruzi Infection of Mammalian Host Cells "in vitro". Mol. Biochem. Parasitol., 23: 63-69.
10. Azevedo, H.P. y Roltman, I. 1984. Cultivation of Trypanosoma cruzi in defined

media. En: Genes and Antigens of Parasites. Morel, M (Ed). Inst. Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro, Brasil. pp 29-36.

11. Biagi, C., Guzmán-García, C., Navarrete, F., Tay, J., Partilla, J. y Olivares, S. 1958. Enfermedad de Chagas en Tutuapan, Estado de México. Prensa Med. Mex., 22: 463-465.

12. Biagi, F.F., Tay, J., Guzmán, G.C. y Fong, P.F. 1964. Tetitlán Guerrero Foco Endémico de la Enfermedad de Chagas. Rev. Fac. Med., 6: 625-631.

13. Boschetti, M.A., Piras, M.M., Henríquez, D. y Piras, R. 1987. The Interaction of a Trypanosoma cruzi Surface Protein with Vero Cells and its Relationship with Parasite Adhesion. Mol. Biochem. Parasitol., 24: 175-184.

14. Brener, Z. 1973. Biology of Trypanosoma cruzi. Annu. Rev. Microbiol., 27: 347-332.

15. Cheng, T.C. 1986. General Parasitology. Academic Press College. New York. 827pp.

16. Chiari, E y Camargo, E.P. 1984. Culturing and Cloning of Trypanosoma cruzi. En: Genes and Antigens of Parasites. Morel, M (Ed). Inst. Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro, Brasil. pp 23-26.

17. Contreras, V.T., Salles, J.M., Thomas, N., Morel, C.N. y Goldenberg S. 1985. In vitro Differentiation of Trypanosoma cruzi under Chemically Defined Conditions. Mol. Biochem. Parasitol., 16: 315-327.

18. Cuarteto, C.M., Ponce, C.E. y Recio, R. 1967. Cinco Nuevos Casos de Enfermedad de Chagas en Zacatecas y Jalisco, República Mexicana. Sal. Púb. Méx., 27: 29-36.

19. Deane, M.P., Morlearty, P.L. y Thomaz, N. 1984. Cell Differentiation in Trypanosomatids and Other Parasitic Protozoa. En: Genes and Antigens of Parasites. Morel, M (Ed). Inst. Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro, Brasil. pp 11-22.

20. De Andrade, A.F.B., Esteves, M.J.C., Angluster, J., Gonzáles, P.M. y Goldenberg, S. 1991. Changes in Cell Surface Carbohydrates of Trypanosoma cruzi during Metacyclogenesis under Chemically defined Conditions. J. Gen. Microbiol., 137: 2845-2849.

21. De Araújo-Jorge, T.C. y De Souza, W. 1984. Effect of Carbohydrates, periodate and enzymes in the process of endocytosis of Trypanosoma cruzi by macrophages. Acta Trop., 41: 17-28.
22. De Araújo-Jorge, T.C. y De Souza, W. 1986. Interaction of Trypanosoma cruzi with Macrophages: Effect of Previous Incubation of the Parasites or the Host Cells with Lectins. Z. Parasitenkd., 72: 153-171.
23. De Araújo-Jorge, T.C., Sampaio, E.P. y De Souza, W. 1986. Trypanosoma cruzi: Inhibition of Host Cell Uptake of Infective Bloodstream Forms by alpha-2-macroglobulin. Z. Parasitenkd., 72: 577-584.
24. De Araújo-Jorge, T.C. 1989. The Biology of Trypanosoma cruzi- Macrophage Interaction. Mem. Inst. Oswaldo Cruz., 84: 441-462.
25. De Castro, S.L. y De Meirelles, M.N. 1986. Effect of Drugs on Trypanosoma cruzi and on its interaction with Heart Muscle Cell "in vitro". Mem. Inst. Oswaldo Cruz., 82: 209-218.
26. De Meirelles, M.N.L., De Araújo-Jorge, T.C. y De Souza, W. 1980. Interaction of epimastigote and trypomastigote forms of Trypanosoma cruzi with Chicken Macrophages in vitro. Parasitology, 81: 373-381.
27. De Meirelles, M.N.L., De Araújo-Jorge, T.C. y De Souza, W. 1982. Interaction of Trypanosoma cruzi with Macrophages In vitro: Dissociation of the Attachment and Internalization Phase by low Temperature and Cytochalasin B. Parasitol. Res., 68: 7-14.
28. De Meirelles, M.N.L.; Chiari, E. y De Souza, W. 1982. Interaction of Bloodstream, Tissue Culture-Derived and Axenic Culture-Derived Trypomastigotes of Trypanosoma cruzi with macrophages. Acta Trop., 39: 195-203.
29. Dietrich, P., Dussan, M.P., Floeter-Winter, L.M., Affonso, M. H.T., Camargo, E.P. y Soares, M.B. 1990. Restriction Fragment Polymorphisms in the Ribosomal Gene Spacers of Trypanosoma cruzi and Trypanosoma conorhini. Mol. Biochem. Parasitol., 42: 13-20.
30. Domínguez, V.A., Ricárdez, E.J.R. y Espinoza, M.E. 1990. Estudio de Reservorios Silvestres del Trypanosoma cruzi en la Reserva Ecológica de "El Zapotal", Chiapas, México. Bol. Chil. Parasitol., 45: 3-8.

31. Dusanic, D.G. 1980. In vitro Production of Metacyclic Trypomastigotes of Trypanosoma cruzi. J. Parasitol., 66: 1046-1049.
32. Dvokak, J.A., Hartman, D.L. y Miles M.A. 1980. Trypanosoma cruzi: Correlation of Growth Kinetics to Zymodeme Type in Clones Derived from Various Sources. J. Protozool., 27: 472-474.
33. Dvokak, J.A. 1984. The Natural Heterogeneity of Trypanosoma cruzi: Biological and Medical Implications. J. Cell. Biochem., 24: 357-371.
34. Engman, D.M., Reddy, L.V., Donelson, J.E. y Kirchho, L.V. 1987. Trypanosoma cruzi Exhibits Inter and Intra-Strain Heterogeneity in Molecular Karyotype and Chromosomal Gene Location. Mol. Biochem. Parasitol., 22: 115-123.
35. Esteves, M.G., González-Perdomo, M., Alviano, C.S., Angluster, J. y Goldenberg, S. 1989. Changes in Fatty Acid Composition Associated with Differentiation of Trypanosoma cruzi. FEMS Microbiol. Lett., 59: 31-34.
36. Giovanni-De-Simone, S., Pontes, C.L.C., Oliva, O.I.P., Andrade, S.G. y Galvao-Castro, B. 1987. Trypanosoma cruzi Strain-Specific Monoclonal: Identification of Colombian Strain Flagellates in the Insect Vector. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg., 81: 750-754.
37. Gloss, G., Barrera, M.R., Montéon, V.M. y Reyes, P.A. 1990. Tripanosomiasis Americana y Cardiopatía Chagásica Crónica en el Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez. Arch. Inst. Cardiol. Méx., 60: 261-266.
38. Goldsmith, R.S., Zárate, R.J., Kagan, I., Cedeño-Ferreira, J., Galindo-Vasconcelos, M.G. y Paz, A.E. 1978. El Potencial de la Transmisión en la Enfermedad de Chagas por Transfusión Sanguínea: Hallazgo Serológico Entre Donadores en el Estado de Oaxaca. Sal. Púb. Méx., 22: 439-444.
39. Goldsmith, R.S., Ortega, M., Zárate, R.J., Zárate, L.G. y Beltran, F. 1983. Encuesta Seroepidemiológica de la Enfermedad de Chagas en Chiapas, México. Arch. Invest. Méd., 14: 43-50.
40. Goldsmith, R.S., Zárate, R.J., Zárate, L.G., Kagan, I. y Jacobson, B. 1985. Clinical and Epidemiologic Studies of Chagas Disease in Rural Communities in Oaxaca State, México, and a Seven-Year Follow-up: I Cerro del Aire. Bull. Pan. Am.

Health. Organ., 19: 120-138.

41. Grace, T.D.C. 1962. Establishment of Four Strains of Cells from Insect Tissues Grown in vitro. Nature, 195: 788-789.

42. Hendricks, L.D., Wood, D.E. y Hajduk, M.E. 1978. Haemoflagellates: Commercially Available Liquid Media for Rapid Cultivation. Parasitology, 76: 309-316.

43. Hoffman, C.C. 1928. Nota Acerca de un Probable Transmisor de la Tripanosomiasis Humana en el Estado de Veracruz. Rev. Mex. Biol., 8: 12-18.

44. Homsy, J.J.; Granger B y Krassner, S.M. 1989. Some Factors Inducing Formation of Metacyclic Stages of Trypanosoma cruzi. J. Protozool. 36: 150-153.

45. Hudson, L. y Britten, V. 1985. Immune Response to South American Tripanosomiasis and its Relationship to Chagas' disease. British Med Bull. 41: 175-180.

46. Joiner, K., Sher, A., Gaitter, T. y Hammer, C. 1986. Evasion of Alternative Complement Pathway by Trypanosoma cruzi Results from Inefficient Binding of Factor B. Immunology., 83: 6593-6597.

47. Katz, M., Despommier, D.D. y Gwadz, R.W. 1988. Parasitic Diseases. Springer-Verlag. New York. 301 pp.

48. Kipnis, T.L., Galich, V.L.G. y Da Silva, D.W. 1979. Active Entry of Blood Stream Forms of Trypanosoma cruzi into Macrophages. Parasitol., 78: 89-98.

49. Kipnis, T.L., David, J.R., Alper, C.A., Sher, A. y Da Silva, W.D. 1981. Enzymatic Treatment Transform Trypomastigotes of Trypanosoma cruzi into Activators of Alternative Complement Pathway and Potentiates their Uptake by Macrophages. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 78: 602-605.

50. Kloetzel, J.K., Morales, R.M. y Umezawa, E.S. 1982. Distinct Macrophages Surface Proteins Mediate Interiorization of bloodstream and culture trypomastigotes. Ann. IX Meet. Chagas' Disease, Caxambu, Brazil. 58pp.

51. Kolb-Bachofen, V., Schlepper-Schafer, J., Roos, P., Hulsmann, D. y Kolb, H. 1984. GalNac/Gal-specific Rat Liver Lectins: Their Role in Cellular Recognition. Biol.

Cell., 51: 219-226.

52. Krassner, S.M., Granger, B., Phersanghnam, P., Le, T. y Linden, V. 1990. Further Studies on Substrate Inducing Metacyclogenesis in Trypanosoma cruzi. J. Protozool., 37: 128-132.
53. Krassner, S.M., Granger, B., Lee, P., Guerra, C., Le, T y Luc, K-O. 1991. Action of Exogenous Potassium and Calcium Ions on in vitro Metacyclogenesis in Trypanosoma cruzi. J. Protozool., 37: 602-608.
54. Kress, Y., Tanowitz, H., Bloom, B. y Wittner, M. 1977. Trypanosoma cruzi: Infection of Normal and Activated Mouse Macrophages. Exp. Parasitol. 41: 385-396.
55. Landegren, U. 1984. Measurement of Cell Number by Means of the Endogenous Enzyme Hexosaminidase. Applications to Detection of Lymphokines and Cell Surface Antigens. J. Immunol. Method., 67: 379-388.
56. Levine, N.D., Corliss, J.O., Cox, F.E.G., Deroux, G., Grain, J., Honigberg, B.M., Leadale, G.F., Loeblich, A.R., Lom, J., Lynn, D., Merinfeld, E.G., Page, E.C., Poljansky, G., Sprague, V., Vavra, J. y Wallace, F. G., 1980. A Newly Revised Classification of the Protozoa. J. Protozool., 27: 37-58.
57. Martínez, P.M.L., Martín, F.E. 1981. Una Nueva Cepa de Trypanosoma Tipo cruzi, con Localización Peritoneal Preferente. Sal. Púb. Méx., 23: 23-24.
58. Mazzotti, L. 1940. Dos Casos de Enfermedad de Chagas en el Estado de Oaxaca. Gac. Med. Méx., 70: 417-420.
59. Mazzotti, L. y Dias, E. 1949. Resumen de los Publicados Sobre Enfermedad de Chagas en México. Rev. Soc. Mex. Hist. Nat., 10: 103-111.
60. Mortara, R.A. 1991. Trypanosoma cruzi: Amastigotes and Trypomastigotes Interact with Different Structures on the Surface of HeLa Cells. Exp. Parasitol., 73: 1-14.
61. Neufeld, E.F y Ashwell, G. 1979. Carbohydrate-Recognition Systems for Receptor-Mediated Pinocytosis. En: Biochemistry of Glycoproteins and Proteoglycans. Lennarz, W.J. (Ed). Plenum Press, New York. pp 241-266.

62. Nogueira, N., Blanco, C. y Cohn, Z. 1975. Studies of the Selective Lysis and Purification of *Trypanosoma cruzi*. *J. Exp. Med.*, 142: 224-229.
63. Nogueira, N. y Cohn, Z. 1976. *Trypanosoma cruzi*: Mechanism of Entry and Intracellular Fate in Mammalian Cells. *J. Exp. Med.*, 143: 1402-1420.
64. Nogueira, N., Chaplan, S y Cohn, Z. 1980. *Trypanosoma cruzi*: Factors Modifying Ingestion and Fate of Blood Form Trypomastigotes. *J. Exp. Med.*, 152: 447-451.
65. OPS. 1990. Las Condiciones de Salud en las Américas. Vol. I. OPS. pp 171-174.
66. Ortega, C.J. 1980. Determinación Electroforética de Patronas Isoenzimáticos de Aislados Mexicanos de *Trypanosoma cruzi*. Tesis Prof. Fac. Química, U.N.A.M. 48pp.
67. Ortega, G.M., Beltrán, H.F. y Zavala, V.J. 1976. Enfermedad de Chagas en Chiapas. *Sal. Pùb. Mèx.* 18: 837-843.
68. Ouaisi, M.A., Cornette, J. y Capron, A. 1985. *Trypanosoma cruzi*: Modulation of Parasite-Cell Interaction by Plasma Fibronectin. *Eur. J. Immunol.*, 15: 1096-1101.
69. Ouaisi, M.A., Cornette, J., Afchain, D., Capron, A., Gras-Masse, H. y Tartar, A. 1986. *Trypanosoma cruzi* Infection inhibited by Peptides Modeled from a Fibronectin Cell Attachment Domain. *Science*, 234: 603-307.
70. Palencia, L. y Montañó, E. 1959. Un nuevo Caso de Tripanosomiasis en México. *Rev. Fac. Med.*, 1: 737-740.
71. Ramos, C., Lamoyi, E., Feoli, M., Rodriguez, M., Pérez, M y Ortiz-Ortiz, L. 1978. *Trypanosoma cruzi*: Immunosuppressed Response to Different Antigens in the Infected Mouse. *Exp. Parasitol.*, 45: 190-199.
72. Ramos, C., Shädtler-Siwon, I y Ortiz-Ortiz, L. 1979. Suppressor Cells Present in the Spleens of *Trypanosoma cruzi*-Infected Mice. *J. Immunol.*, 122: 1243-1247.
73. Salazar, S.P.M., De Haro, A.I., Martínez, J.J. y García, C.E. 1983. Dos Nuevas Localizaciones de Transmisores de la Enfermedad de Chagas en la República



Mexicana. Sal. Páb. Méx., 25: 77-82.

74. Salazar, S.P.M., Tay, J., Hernández, R.L., De Haro, A.I., Bucio, I., Jiménez, J., García, Y.Y. y Gutiérrez, M. 1984 a. Seropositividad a Trypanosoma cruzi en Cuatro Grupos de Población del Estado de Oaxaca. Sal. Páb. Méx., 26: 589- 595.

75. Salazar, S.P.M., Tay, J., Bucio, M.I., De Haro, A.I., Anzures, M.E. y Flores, A.S. 1984 b. Primer Caso de Megaesófago con Serología Positiva a Trypanosoma cruzi. Sal. Páb. Méx., 26: 452-455.

76. Salazar, S.P.M., De Haro, A.I. y Uribarren, B.T. 1988. Chagas Disease in México. Parasitol. Today., 4: 348-351.

77. Sanderson, C.J., Thomas, J.A. y Twomey, C.E. 1980. The Growth of Trypanosoma cruzi in Human Diploid Cells for the Production of Trypomastigotes. Parasitology, 80: 153-162.

78. Schenone, H. y Rojas, A. 1989. Algunos Datos y Observaciones Pragmáticas en Relación a la Epidemiología de la Enfermedad de Chagas. Bol. Chil. Parasitology, 44: 66-86.

79. Schmidt, G.D. y Roberts, L.S. 1984. Fundamentos de Parasitología. C.E.C.S.A. México. 655pp.

80. Segura, E.L y Cappa, G.S.M. 1985. Relación Huesped-Parásito en Trypanosoma cruzi. En: Factores Biológicos y Ecológicos en la Enfermedad de Chagas. Carvalho, R.U., Rabinovich, J.E y Tonn, R.J (Eds). Tomo II. Eco. SNCH. Buenos Aires Argentina. pp 263-267.

81. Sleigh, M.A. 1989. Protozoa and Other Protists. Cambridge University Press. New York. 342pp.

82. Snary, D. 1985. Receptor and Recognition Mechanisms of Trypanosoma cruzi. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg., 79: 587-590.

83. Souto-Padrón y De Souza, W. 1989. The Effect of Tunicamycin and Monesin on the Association of Trypanosoma with Resident Macrophages. Parasitol. Res., 76: 98-106.

84. Stahl, D; Wilkeman. T.E; Diment, S. y Shepherd, V.L. 1984. Mannose-Specific

- Oligosaccharide Recognition by Mononuclear Phagocytes. Biol. Cell., 51: 215-218.
85. Sullivan, J.J. 1982. Metacyclogenesis of Trypanosoma cruzi In vitro: A Simplified Procedure. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg., 76: 300-303.
86. Tardieux, I., Webster, P., Ravestloot, J., Boron, W., Luhn, J.A., Heuser, J.E. y Andrews, N.W. 1992. Lysosome Recruitment and Fusion are Early Events Required for Trypanosome Invasion of Mammalian Cells. Cell, 71: 1117-1130.
87. Tay, J., Ontiveros, D., Ortega, M. y Torres, J. 1969. Estado Actual de los Conocimientos Sobre Infección en Vertebrados por la Enfermedad de Chagas en México. Bol. Oficina. Sanit. Panam., 67: 310-314.
88. Tay, J., Salazar, S.P.M., Velasco, C.M., De Haro, A.I., García, Y.Y. y Gitiérrez, Q.M. 1979. Estudio Epidemiológico de la Enfermedad de Chagas en el Estado de Jalisco, República Mexicana. Sal. Pùb. Méx., 22: 145-149.
89. Tay, J. 1980. Evolución del Trypanosoma cruzi Cepa Mexicana en el Huésped Vertebrado, Invertebrado e In Vitro. Sal. Pùb. Méx., 22: 513-520.
90. Tay, J., Aguilera, R.L., Castrejón-Velasco, O. y Quiroz, G.M. 1984. Parasitología Médica. Francisco Méndez Cervantes. México. 105-127pp.
91. Tay, J., Salazar, S.P.M., Ontiveros, A., Jiménez, J., De Haro, A.I., García, Y.Y. y Gutiérrez, Q. 1986. Epidemiologic Study of Chagas Disease in a Town in Oaxaca, México. Bull. Pan. Am. Health. Organ., 20: 358-365.
92. Tibayrec, M., Ward, P., Moya, A. y Ayala F.J. 1986. Natural Populations of Trypanosoma cruzi, the Agent of Chagas Disease, Have a Complex Multiclonal Structure. Evolution, 83: 115-117.
93. Tibayrec, M. y Ayala, F.J. 1988. Chagas Disease: Genetical, Taxonomical, and Epidemiological Significance. Evolution. 42: 277-292.
94. Vargas, P.L.C. 1992. Efecto del Fierro en la Diferenciación y Crecimiento de Trypanosoma cruzi. Tesis Prof. Inst. Invest. Blomédicas. U.N.A.M. 66pp.
95. Velasco-Castrejón, O., Guzmán, B.C., Cruz, R.J., López, O.O. y Domínguez, G.F. 1991. La Enfermedad de Chagas. INDRE. 56pp.

96. Velasco-Castrejón, O., Valdespino, J.L., Tapia-Conyer, R., Salvatierra, B., Guzmán-Bracho, C., Magos, C., Llausas, A., Gutiérrez, G. y Sepúlveda, J. 1992. Seroepidemiología de la Enfermedad de Chagas en México. Sal. Pùb. Mèx., 34: 186-196.
97. Villalta, F. y Kierszenbaum, F. 1983. Role of Cell Surface Mannose Residue in Host Cell Invasion by Trypanosoma cruzi. Biochim. Biophys. Acta., 736: 39-44.
98. Villalta, F. y Kierszenbaum, F. 1984. Host-Cell Invasion by Trypanosoma cruzi: Role of Cell Surface Galactose Residues. Biochem. Biophys. Res. Commun., 119: 228-235.
99. Villalta, F. y Kierszenbaum, F. 1985. Role of Surface N-acetyl-glucosamine Residues on Host Cell Infection by Trypanosoma cruzi. Biochim. Biophys. Acta., 845: 216-222.
100. W.H.O. 1986. Research Activities of the Scientific Working Group (SWG) on Chagas Disease 1982-1985. Mem. Inst. Oswaldo Cruz., 81: 179-244.
101. Williams, D.M. y Remington, J.S. 1977. Effect of Human Monocytes and Macrophages on Trypanosoma cruzi. Immunology, 32: 19-23.
102. Wirth, J.J. y Kierszenbaum, F. 1984. Fibronectin Enhances Macrophage Association with Invasive Forms of Trypanosoma cruzi. J. Immunol., 133: 460-464.
103. Wirth, J.J., Kierszenbaum, F., Gerald, S. y Zlotnik, A. 1985. Enhancing Effects of Gamma Interferon on Phagocytic Cell Association with and Killing of Trypanosoma cruzi. Infect. Immun. 49: 61-66.
104. Wyler, D.J. 1990. Modern Parasite Biology. Freeman. New York. pp 64-78.
105. Yakubu, M.A., Basso, B. y Kierszenbaum, F. 1992. DL- $\alpha$ -Difluoromethylarginine Inhibits Intracellular Trypanosoma cruzi Multiplication by Affecting Cell Division but not Trypomastigote-Amastigote Transformation. J. Parasitol., 78: 414-419.
106. Yakubu, M.A., Majunder, S. y Kierszenbaum, F. 1993. Inhibition of 5-Adenosyl-L- Methionine (Adomet) Decarboxylase by the Decarboxylated Adomet Analog 5'- ((z)-4- Amino-2- Butenyl) Methylamino)- 5'-Deoxyadenosine (MDL73811) Decrease the Capacities of Trypanosoma cruzi to Infect and Multiply

Within a Mammalian Host Cell. J. Parasitol., **79**: 525-532.

107. Yoshida, N. 1975. A Macromolecule-Free Partially Defined Medium for Trypanosoma cruzi. J. Protozool., **22**: 128-130.

108. Zavala-Castro, J.E., Velasco-Castrejón, O. y Hernández, R. 1992. Molecular Characterization of Mexican Stock of Trypanosoma cruzi Using Total DNA. Am. J. Trop. Med. Hyg. **47**: 201-209.

109. Zenlan, A. y Kierszenbaum, F. 1983. Trypanosoma cruzi: Differences in Cell Surface Interaction of Circulating (trypomastigotes) and Culture (epimastigotes) Forms with Macrophages. J. Parasitol., **69**: 660-665.

## A P E N D I C E I.

Medios de cultivo para Trypanosoma cruzi.

## A) Medio LIT.

## Composición:

- Cloruro de Sodio (NaCl)	4.0 g.
- Cloruro de Potasio (KCl)	0.4 g.
- Fosfato dibásico de sodio ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ )	8.0 g.
- Glucosa (o dextrosa)	2.0 g.
- Triptosa (DIFCO, núm de cat. 0124-01-0)	5.0 g.
- Infusión de Caldo de Hígado (DIFCO, núm. cat. 0269-17-7).	5.0 g.
- Hemina* (SIGMA, núm de cat.H-2250)	25.0 mg.
- Suero Fetal de Bovino **	100 ml.
(GIBCO, núm de cat. 200-614AJ)	

\* Se pesan 0.25 g de hemina y se disuelven en 5ml de trietanol amina (SIGMA, num de cat.T-1377) (Se mantiene a 4°C y en oscuridad).

\*\* El SFB, se inactiva a 56°C durante 30 min.

**Modo de preparación:**

Todos los componentes del medio, excepto el SFB y la hemina se disolvieron en 1000 ml de agua bidestilada, ajustándose después el pH a 7.2 , enseguida se esteriliza en autoclave a 120°C y a una presión de 1 atmósfera durante 20 min. Después se le somete a una prueba de esterilidad, dejándose a temperatura ambiente durante un período mínimo de tres días y en oscuridad; al término de este período se complementa con la hemina, tomándose 50  $\mu$ l por cada 100 ml de medio a complementar (quedando a una concentración de 25  $\mu$ g de hemina/ml) y con el 10% de SFB inactivado. Previo a su uso se realiza la misma prueba de esterilidad ya mencionada.

**B) Medio TAUP.****Composición:**

- Cloruro de Sodio (NaCl)	11.11 g.
- Cloruro de Potasio (KCl)	1.26 g.
- Cloruro de Calcio (CaCl <sub>2</sub> )	0.22 g.
- Cloruro de Magnesio (MgCl <sub>2</sub> )	0.40 g.

**Buffer de Fosfatos:**

- Fosfato Monobásico (NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O)	1.10 g,
y dibásico (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ) de sodio	1.13 g.

**Modo de preparación:**

El medio TAUP se prepara pesando los componentes anteriores y disolviéndolos en un litro de buffer de fosfatos, (preparado con agua destilada), después se esteriliza con un filtro de 22  $\mu$ m de poro y enseguida se le deja tres días a temperatura ambiente como prueba de esterilidad, transcurrido este tiempo, cada

100 ml de medio se suplementa con 2.5% (v/v) de una solución al 1.4 % de carbonato de sodio ( $\text{NaHCO}_3$ ), 500 unidades de penicilina/ml y 10 mM de L-Prolina.

**C) Medio Grace.**

El medio Grace se encuentra disponible comercialmente, para los distintos experimentos se empleó el de la marca GIBCO, núm de cat.440-1300EL; para su preparación se pesan 46.26g y después se afora a un litro con agua bidestilada, y una vez disuelto se ajusta el pH a 7.2 con HCl o NaOH 2N. Enseguida se prefiltra con un filtro Whatman del número 1 y se esteriliza por filtración empleando un filtro con poro de  $22 \mu\text{m}$ . Finalmente se complementa con 10% de SFB inactivado.



## A P E N D I C E II.

**A) Preparación del colorante Giemsa.**

**Solución madre:** para su preparación se pesan 0.75 g de colorante Giemsa (SIGMA, núm de cat G9641 ) y se disuelven en 65 ml de metanol absoluto y 35 ml de glicerina pura. Una vez preparado el colorante se filtra con papel filtro Whatman del número 1 y se guarda en frasco ambar bien tapado.

**Solución de trabajo:** esta solución se prepara diluyendo 5ml de solución madre de Giemsa en 45 ml de buffer de fosfatos. El buffer de fosfatos se prepara con 1.14 g de fosfato monobásico de sodio ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) y 0.49g de fosfato dibásico de potasio ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ), a pH de 7.2 ajustado con HCl o NaOH 1N, para después aforarse a 1 l con agua destilada.