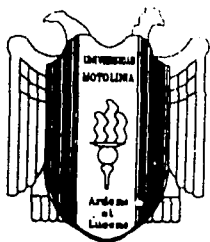


302827



UNIVERSIDAD MOTOLINIA, A. C. <sup>1</sup> *2ej*

ESCUELA DE QUIMICA

CON ESTUDIOS INCORPORADOS A LA U.N.A.M.

CARACTERIZACION BIOLOGICA DE CUATRO CEPAS  
DE *Trypanosoma cruzi*

**T E S I S**  
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE  
**QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO**  
P R E S E N T A :  
SILVIA AGUILAR PEREZ

FALLA DE ORIGEN

MEXICO, D.F.

1995



Universidad Nacional  
Autónoma de México



## **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.

**A DIOS**

**POR ILUMINAR MI VIDA**

**PORQUE SIN TENER ALAS  
HEMOS VOLADO A LUGARES TAN APARTADOS;  
SERIA REALMENTE UNA LASTIMA CONFORMARSE  
CON UN PEDACITO DEL VASTO CIELO QUE NOS HA SIDO OTORGADO....**

**A MIS PADRES**

**DANIEL AGUILAR JIMENEZ      AMANDA PEREZ DE AGUILAR**

**QUIENES HOY Y SIEMPRE  
ME HAN ENSEÑADO A NO TENER MIEDO  
DE VOLAR MAS ALTO;  
SINO A DECIDIR  
EL MOMENTO Y EL LUGAR  
MAS ADECUADO PARA HACERLO**

**GRACIAS**

**POR HABERME AYUDADO  
A  
EMPRENDER EL VUELO**

**LOS AMO**

**A MIS HERMANOS**

**GUSTAVO, ALEJANDRA Y ROCIO**

**QUE TAN DIFERENTES ENTRE SI;  
SE ESTAN FORJANDO EL CAMINO AL EXITO  
EN SUS RESPECTIVAS VOCACIONES  
Y ELLO ME HA MOTIVADO  
A SEGUIR ADELANTE  
Y CUMPLIR MIS METAS Y OBJETIVOS PROPIOS**

**A USTEDES**

**PORQUE SIEMPRE ESTEMOS  
UNIDOS  
EN EL VINCULO DEL AMOR**

**A MI NOVIO**

**CARLOS VELASCO**

**POR HACER CADA MOMENTO ESPECIAL,  
POR TU APOYO INCONDICIONAL  
Y  
TU GRAN AMOR**

**TE AMO**

**A MIS PROFESORES**

**CON CARÍO, RESPETO  
Y  
ADMIRACION**

**EN ESPECIAL A:**

**DR. BENJAMIN NOGUEDA TORRES  
Y EL  
M.C. RICARDO ALEJANDRE AGUILAR**

**A LA  
UNIVERSIDAD MOTOLINIA**

**QUE APORTO  
LOS CONOCIMIENTOS PARA MI DESARROLLO  
PROFESIONAL.**

**CON PROFUNDO AGRADECIMIENTO**

**El presente trabajo se realizó en el laboratorio de Entomología del Departamento de Parasitología de la ENCB bajo la asesoría del M. en C. Ricardo Alejandro Aguilar. El proyecto de investigación forma parte del Programa " Estudio de los transmisores y del agente etiológico de la enfermedad de Chagas", financiado por DEPI-IPN**



# INDICE

## CAPITULO I

### INTRODUCCION

1.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA .....	1
1.2 OBJETIVO GENERAL.....	2
1.3 OBJETIVOS PARTICULARES .....	2

## CAPITULO II

### ANTECEDENTES

2.1 DEFINICION .....	3
2.2 CARACTERIZACION DE CEPAS <u>Trypanosoma cruzi</u> .....	3
2.3 ANTECEDENTES HISTORICOS .....	4
2.4 ETIOLOGIA.....	8
2.5 MECANISMOS DE TRANSMISION .....	8
2.6 BIOLOGIA Y CICLO DE VIDA DEL PARASITO .....	8
2.6.1 CICLO DE VIDA EN EL HUESPED INVERTEBRADO .....	8
2.6.2 CICLO DE VIDA EN EL HUESPED VERTEBRADO .....	9
2.7 MANIFESTACIONES CLINICAS DE LA ENFERMEDAD .....	9

## CAPITULO III

### PARTE EXPERIMENTAL

3.1 DIAGRAMA GENERAL.....	11
3.2 MATERIAL Y METODOS.....	12

3.2.1 MATERIAL BIOLÓGICO .....	12
3.2.2 MATERIAL DE LABORATORIO.....	12
3.2.3 EQUIPO .....	13
3.2.4 REACTIVOS.....	13
3.3 METODOLOGÍA .....	13

## **CAPÍTULO IV**

### **RESULTADOS**

4.1 RESULTADOS .....	17
4.2 DISCUSIÓN .....	27

## **CAPÍTULO V**

CONCLUSIONES.....	33
BIBLIOGRAFÍA.....	34

# CAPITULO I

## INTRODUCCION

### 1.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La enfermedad de Chagas o Tripanosomiasis Americana es una enfermedad de curso agudo y crónico, causada por un parásito intracelular llamado *Trypanosoma cruzi*, siendo transmitida al hombre y a otros mamíferos por la picadura de un hemíptero hematófago conocido como triatomino (Carrada, 1983)

México se considera un país endémico para esta enfermedad y existen regiones en que se propone a la Enfermedad de Chagas como un problema de salud pública. (Tay, 1980; Velasco, 1986)

*Trypanosoma cruzi* no es una especie unitaria, es considerado como un complejo biológico de poblaciones parasitarias que circulan en la naturaleza entre los seres humanos, animales domésticos, reservorios salvajes y vectores selváticos y domiciliarios. (Pinto, 1984; Brener, 1975)

Es notable la extrema variabilidad de las formas clínicas en que se presenta la enfermedad de Chagas, teniéndose cuadros severos de cardiopatías y/o dilatación de segmentos del tracto digestivo (megaesófago y megacolon), hasta una aparente ausencia de síntomas (Brener, 1985).

Por lo que existen evidencias experimentales en relación a la heterogeneidad de las poblaciones de *T. cruzi* que van desde variaciones morfológicas y fisiológicas hasta patogénicas que han permitido identificar cepas diferentes (Velasco, y cols 1991)

Estas diferencias han motivado a correlacionar las características biológicas de los aislamientos de *T. cruzi*, en base a las características morfológicas propuestas por la OMS (Organización Mundial de la Salud). (W.H.O., 1985)

1. Morfología típica de los tripomastigotes sanguíneos.
2. Curvas de parasitemia.
3. Organotropismo.
4. Virulencia.
5. Susceptibilidad a fármacos.

## 1.2 OBJETIVO GENERAL

Evaluar el comportamiento biológico de cuatro cepas de *Trypanosoma cruzi* aisladas en México.

## 1.3 OBJETIVOS PARTICULARES

- a) Observar los posibles cambios morfológicos de *Trypanosoma cruzi* durante la parasitemia.
- b) Determinar los niveles parasitémicos presentados durante la infección.
- c) Establecer la relación entre virulencia y mortalidad en animales parasitados.

## CAPITULO II

## ANTECEDENTES

### 2.1 DEFINICION

La Tripanosomiasis Americana o enfermedad de Chagas es una antropozoonosis provocada por un parásito hemoflagelado denominado *Trypanosoma cruzi*, que causa una parasitosis hemática y tisular, esta última afecta principalmente a las células del miocardio, esófago y colon, donde produce daño crónico e irreversible, se considera una de las seis enfermedades tropicales más importantes del mundo (Carrada, 1983; Romero, 1978)

La Enfermedad de Chagas, al igual que muchas parasitosis, está considerada como una "enfermedad de la pobreza", ya que afecta principalmente a individuos de zonas rurales, en donde la endemia se mantiene debido a las precarias condiciones socioeconómicas de la población, situación que favorece la proliferación de los triatomíneos, aunque actualmente, la enfermedad se ha encontrado en zonas urbanas y suburbanas debido al factor migratorio de la población (Kumate, y cols 1990; Tay, 1980)

*Trypanosoma cruzi* es considerado como un complejo biológico de poblaciones parasitarias que circulan en la naturaleza, debido al gran número de huéspedes y transmisores. Lambrecht (1965) indica que el movimiento de huéspedes y/o transmisores hacia nuevas áreas geográficas donde existan especies que puedan actuar como tales, darían como resultado la formación de cepas nuevas. Estas difieren con frecuencia, en su virulencia para el ratón blanco medida por número de tripomastigotes sanguíneos y en su afinidad para diferentes tejidos. (Bice y Zeledón, 1970)

### 2.2 CARACTERIZACION DE CEPAS DE *T. cruzi*

La caracterización de aislamientos y/o clones de *T. cruzi* puede ser:

- a) Biológica
- b) Bioquímica
- c) Inmunológica

a) La caracterización biológica comprende los siguientes estudios:

- 1) Morfología de los tripomastigotes sanguíneos.
- 2) Curvas de parasitemia en ratón albino.
- 3) Histotropismo de las formas sanguíneas.
- 4) Infectividad a células.
- 5) Susceptibilidad de formas sanguíneas a suero inmune.
- 6) Virulencia y morbilidad.
- 7) Sensibilidad a fármacos.

b) La caracterización bioquímica comprende:

- 1) Estudio de zimodemos y esquizodemos.
- 2) Pruebas de DNA.

c) Caracterización inmunológica. Comprende principalmente la caracterización de antígenos y unión a lectinas.

( Brener, 1985 )

### 2.3 ANTECEDENTES HISTORICOS

Desde el descubrimiento de *Trypanosoma cruzi* hasta nuestros días se han realizado numerosos trabajos tendientes a dilucidar el comportamiento que presentan las cepas aisladas en diferentes regiones de América, así como el comportamiento de las cepas que se aíslan en diferentes regiones de un mismo país.



Badines (1946), realizó trabajos con animales de experimentación, los cuales fueron inoculados con diferentes cepas de *Trypanosoma cruzi* unas aisladas de casos humanos y otras a partir de las deyecciones de *Triatoma infestans*. Las vías de inoculación usadas fueron intraperitoneal y subcutánea. Observó que se producían lesiones cutáneas de variable intensidad en el sitio de la inoculación. Durante la necropsia notó que el corazón se encontraba ligeramente aumentado de tamaño por la dilatación de sus cavidades. Así mismo las lesiones hepáticas y esplénicas fueron de intensidad variable, pudiéndose observar en ambos casos un aumento en el volumen de los órganos (Badines, 1946).

Agosin (1949), realizó estudios sobre el comportamiento de diferentes cepas de *T. cruzi* aisladas de diferentes regiones. Este autor observó que la intensidad del parasitismo en los conejos es menor a la obtenida en otros animales de laboratorio, y en los cortes histológicos observó una mayor infección parasitaria del tejido muscular blanco (biceps femoral) sobre el rojo (semitendinoso, masetero) (Agosin, 1949).

Pifano (1965), observó algunos aspectos del comportamiento del *Trypanosoma cruzi* en el vertebrado, utilizando como animales de experimentación lotes de ratones de las cepas CFW y C3H, los cuales fueron inoculados con dos cepas de *T. cruzi* de origen humano, por vía intraperitoneal. Realizó observaciones de sangre periférica, de muestras de sangre de la aurícula derecha, de improntas de hígado y de cortes histológicos. Determinó que en el vertebrado hay dos modalidades evolutivas del protozoario que dan origen a las formas flageladas delgadas y largas, y a formas flageladas anchas y cortas (Pifano, 1965).

Tay, y cols. (1973), realizaron estudios sobre el comportamiento de seis cepas mexicanas de *Trypanosoma cruzi*, aisladas de triatomíneos colectados en diferentes estados de la República Mexicana y de un caso humano, fueron inoculadas por vía intraperitoneal a ratones blancos de la cepa Webster, de ambos sexos y de peso aproximado de 16.5 g con una cantidad de inóculo de un millón y de cuatro millones y medio de tripomastigotes.

A los ratones inoculados se les efectuaron revisiones diarias de sangre periférica hasta los 20 días después de la inoculación, al final de los cuales todos los ratones sobrevivientes fueron sacrificados, extrayéndoles corazón, músculo gastrocnemio, esófago, ganglios cervicales, bazo, hígado, páncreas y cerebro para su estudio histopatológico. También ensayaron diferentes vías de inoculación con tripomastigotes metacíclicos de una sola cepa, y observaron que al utilizar un inóculo mayor se obtuvieron parasitemias más elevadas. Pero durante los diez primeros días después de la inoculación las parasitemias se mantuvieron muy limitadas, independientemente de la cepa y de la cantidad del inóculo, aunque tiende a aumentar después de pasados más días. Se observó la presencia de tripomastigotes sanguíneos a las 17 horas después de la inoculación, aunque no en todos los casos. Es de hacer notar que en general la mayoría de las cepas produjeron parasitemias más elevadas después de que se les mantuvo en el laboratorio durante 10 meses efectuando pases de ratón a ratón, asimismo la cepa humana produjo parasitemias mucho más elevadas en promedio que las otras cepas estudiadas.

La producción de nidos de amastigotes fue mayor en corazón y músculo gástrico, mostrando preferencia por tejido muscular (Tay, y cols. 1973).

Cárdenas-Ramírez, y cols. (1975) inocularon por vía intraperitoneal a ratones de dos semanas de edad con una dosis de un millón de tripomastigotes provenientes de seis especies distintas de vectores localizados en seis diferentes localidades de los estados de Guerrero, Michoacán, Morelos y Zacatecas. Al cabo de 30 días se sacrificaron los ratones extrayéndoles bazo, hígado, esófago, ganglios linfáticos, músculo esquelético, bronquios y tráquea, se fijaron y se incluyeron para estudio histopatológico. Se vieron cambios comunes a todas las cepas, cambios distintos entre ratones infectados con una misma cepa y algunas alteraciones específicas para las distintas cepas. Las alteraciones más notorias ocurrieron en el siguiente orden: en el músculo esquelético, hígado y miocardio. Con un proceso inflamatorio predominando linfocitos,

macrófagos y células plasmáticas y en algunos casos con infiltrado de neutrófilos (Cárdenas-Ramírez, y cols. 1975).

Salazar, y cols. (1975), realizaron estudios sobre una cepa mexicana de *Trypanosoma cruzi* aislada de *Triatoma phyllosoma mazzotti* de la población de Cocula en el estado de Jalisco, inoculando tripomastigotes sanguíneos a 3 lotes de 10 ratones cada uno con 50,000, 1,000,000, 2,000,000 de flagelados por mililitro respectivamente para incrementar la parasitemia. Contaron tripomastigotes en sangre periférica cada tercer día y a los ratones que fallecieron se les hizo necropsia para extraerles el corazón, hígado, bazo, esófago, gastrocnemio, cerebro, ganglios linfáticos, páncreas y tiroides, dichos órganos se fijaron y tiñeron.

Esta cepa produjo parasitemias muy elevadas en todos los casos, con invasión prácticamente a todos los órganos y tejidos que se estudiaron mostrando gran cardiotropismo. Esta cepa estudiada experimentalmente mostró gran poder patógeno y alta virulencia para el ratón (Salazar, y cols. 1975).

Martínez, Martín, (1981), informan el hallazgo de una nueva cepa de *Trypanosoma tipo cruzi* aislada de un ejemplar adulto de *Triatoma phyllosoma*, con localización peritoneal preferente en los ratones de experimentación. Inoculando a ratones hembras con las formas flageladas contenidas en deyecciones de triatóminos, por vía intraperitoneal. Observando flagelados tanto en sangre periférica como en el líquido peritoneal, aunque hubo diferencias en cuanto al tiempo de aparición y desaparición de las formas sanguíneas y de las que se encontraron en el líquido peritoneal.

Este estudio constituye el primer registro con estas características en una cepa de este tripanosomátido en México (Martínez, Martín, 1981).

## 2.4 ETIOLOGIA

El agente etiológico es *Trypanosoma cruzi* (Chagas 1909), parásito flagelado, perteneciente al Phylum Protozoa, subphylum Sarcostigophora, subclase Mastigophora, clase Zoomastigophora, orden Kinetoplastida, suborden Trypanosomatina, familia Trypanosomatidae, género *Trypanosoma*, sección Stercoralia, especie *T. cruzi* (Velasco, 1991).

## 2.5 MECANISMOS DE TRANSMISION

La transmisión natural y más frecuente se lleva a cabo por un mecanismo contaminativo con heces de triatominos (Insecta: Reduviidae) infectados con *T. cruzi*. La fase infectante, el tripomastigote metacíclico, penetra al vertebrado a través de piel escoriada, mucosas sanas e incluso piel indemne (Velasco, 1991), pero también puede ser adquirida in útero (vía transplacentaria, transfusión sanguínea, al desollar animales silvestres o ingerirlos semicrudos, por falta de cuidado en el trabajo de laboratorio y por el trasplante de órganos (Pinto, 1990).

## 2.6 BIOLOGIA Y CICLO DE VIDA DEL PARASITO

Al ser *Trypanosoma cruzi* un parásito heteroxeno, tiene una gran supervivencia debido a su capacidad de adaptación al medio ambiente; posee dos ciclos de vida, uno en un huésped invertebrado y otro en un huésped vertebrado (Tay, y cols. 1981).

### 2.6.1 Ciclo de vida en el huésped invertebrado

Este ciclo comienza cuando un triatoma libre de infección pica a un mamífero (incluyendo al hombre) y succiona la sangre que contiene tripomastigotes sanguíneos (fase infectiva para el insecto), los cuales pasan al intestino del triatoma transformándose en epimastigotes y esferomastigotes, que se multiplican por fisión binaria longitudinal

para convertirse al final del ciclo en tripomastigotes metacíclicos (forma infectante para el mamífero) (Brener, 1971; Tay, y cols. 1981).

### **2.6.2 Ciclo de vida en el huésped vertebrado**

Al alimentarse un triatoma infectado de la sangre de un huésped vertebrado libre de la infección, se produce la defecación del insecto sobre la piel o mucosa del huésped, depositando junto con su excremento a los tripomastigotes metacíclicos. Estos penetran en la piel introduciéndose en una variedad de células, principalmente células musculares y macrófagos en donde adoptan la forma de amastigote, los cuales rápidamente se multiplican por fisión binaria llenando la célula que posteriormente revienta, liberando amastigotes al torrente sanguíneo donde se transforman en tripomastigotes. El flagelado que circula en la sangre por un período variable invade otra célula para realizar su ciclo intracelular. La multiplicación exponencial intracelular del parásito resulta en un incremento gradual de la parasitemia. La mayoría de los pacientes son capaces de desarrollar una respuesta inmune que controla la proliferación del parásito lo cual conduce a la parasitemia a un nivel subpatente, pero no logra la respuesta inmune eliminar del todo al parásito (Nogueira, 1980, Braun, 1985).

El ciclo de vida se completa cuando un triatoma libre de infección, pica, succionando sangre con tripomastigotes sanguíneos, infectándose de ésta manera (Brener, 1971; Tay, y cols. 1981).

## **2.7 MANIFESTACIONES CLINICAS DE LA ENFERMEDAD**

### **FASE AGUDA**

Existe un período de incubación asintomático de 4-10 días. Cuando la transmisión se hizo por triatóminos aparecen las manifestaciones de puerta de entrada con el SIGNO DE ROMANA o bien CHAGOMA de inoculación en otras partes del cuer--

po y evolucionan lentamente ( 2-4 semanas). La temperatura entre 37-38° se acompaña de cefalea, astenia, malestar general, mialgias, artralgias e hiporexia, edema subcutáneo, hepatoesplenomegalia y la cardiopatía, lesión anatomopatológica más constante en esta fase que en casos graves evoluciona hacia la insuficiencia cardíaca.

El pronóstico en la fase aguda generalmente es bueno, el cuadro remite espontáneamente entre los 30 y 90 días posteriores a su instalación. El promedio de muerte en esta fase es de 7 a 10% y generalmente ocurre en infantes.

#### **FASE INDETERMINADA O ASINTOMÁTICA**

Durante esta fase desaparece la sintomatología y el individuo se considera curado. Sin embargo, la serología es positiva en un individuo asintomático con electrocardiograma y radiografía normales para corazón, esófago y colon y comprende la gran mayoría de los chagásicos crónicos menores de 25 años de edad

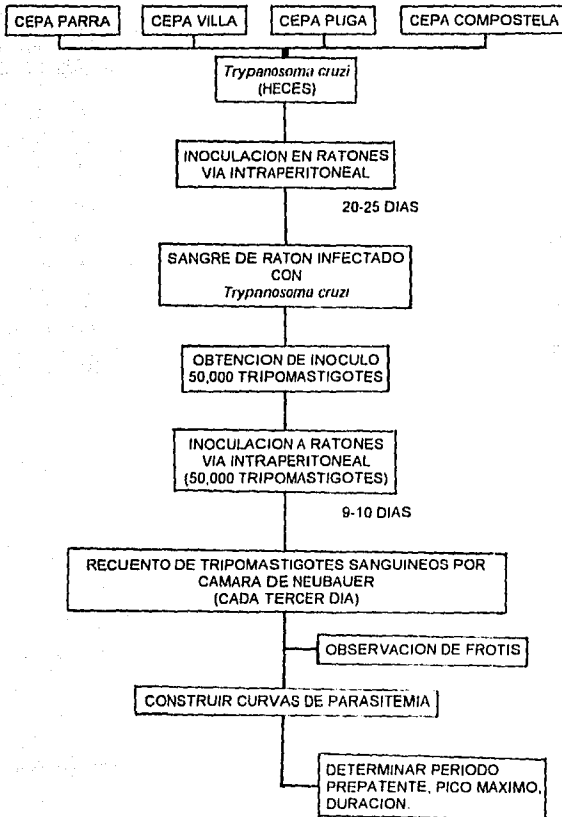
#### **FASE CRÓNICA**

La fase crónica se manifiesta casi siempre en personas de 20-50 años. El cuadro clínico varía considerablemente de acuerdo al grado de insuficiencia cardíaca o al tipo de alteración del ritmo. Pueden presentarse dos formas clínicas, una sintomática en donde los individuos infectados presentan miocardiopatía dilatada (como principal complicación), insuficiencia cardíaca progresiva y muerte, y otra asintomática en la cual el sujeto no tiene manifestaciones clínicas y pudiendo evolucionar de esta forma o no durante toda su vida. El paciente puede cursar con parasitemia esporádica y fugaz y presentar anticuerpos por lo cual será considerado un peligro potencial si llega a ser donador sanguíneo (Velasco, 1991)

## CAPITULO III

## PARTE EXPERIMENTAL

### 3.1 DIAGRAMA GENERAL





## 3.2 MATERIAL Y METODOS

### 3.2.1 MATERIAL BIOLÓGICO

- a) Cepa VILLA de *T. cruzi*: aislada de un caso humano proveniente del Municipio Puga, Tepic Nayarit.
- b) Cepa PARRA de *T. cruzi*: aislada de *Triatoma longipennis* en el Municipio Puga, Tepic Nayarit.
- c) Cepa PUGA de *T. cruzi*: aislada de *Triatoma longipennis* en el Municipio Puga, Tepic Nayarit.
- d) Cepa COMPOSTELA de *T. cruzi*: Aislada de *Triatoma longipennis* en Compostela Nayarit.
- e) Ratones: Cepa NIH, hembras de 20-22 g aproximadamente, proporcionados por el bioterio de la ENCB.

### 3.2.2 MATERIAL DE LABORATORIO

- Boquilla con manguera.
- Cámara de Neubauer.
- Cubreobjetos.
- Equipo de disección.
- Guantes desechables o de cirujano.
- Jaulas para ratones.
- Jeringas con aguja (25X16mm).
- Pipeta de Thoma para glóbulos blancos.
- Portaobjetos.

### 3.2.3 EQUIPO

- \* Microscopio óptico Carl-Zeiss.

### 3.2.4 REACTIVO

- \* Alcohol yodado
- \* Colorante de Giemsa.
- \* Fenol al 5%.
- \* Heparina.
- \* Solución salina al 0.85%.

## 3.3 METODOLOGIA

1) Obtención de tripomastigotes metacíclicos a partir de heces de triatominos. Se alimentan ninfas de triatominos previamente infectados con *Trypanosoma cruzi*, sobre un ratón o conejo libre de infección, una vez repletas se les presiona suavemente el abdomen para obligarlas a defecar, inmediatamente se toma una gota de las heces y se observa al microscopio para confirmar la positividad del insecto. Si la materia fecal presenta más o menos 10 tripanosomas por campo con el objetivo de 40X, se procede a inocular a los ratones.

2) Inoculación a ratones. La materia fecal con tripanosomas metacíclicos se diluye con solución salina al 0.85%, se carga con una jeringa para insulina, aproximadamente 0.2 ml de la dilución (0.1 ml de solución salina al 0.85% más 0.1 ml de heces) y se inocula por vía intraperitoneal a ratones.

3) Observar y cuantificar el curso de la parasitemia para posteriormente elegir uno de los ratones que presente mayor cantidad de hemoflagelados.

4) Conteo de tripanostigotes sanguíneos por medio de cámara de Neubauer para la obtención del inóculo.

Por medio de un corte en la vena caudal del ratón infectado, se obtiene sangre, la cual se recoge con una pipeta de Thoma para glóbulos blancos hasta la marca 0.5 y se diluye con solución salina al 0.85% hasta la marca 11 para obtener una dilución 1:20. Integrar perfectamente.

Colocar la cámara de Neubauer sobre una superficie horizontal y poner el cubreobjetos sobre las mesetas, posteriormente cargar la cámara con una gota de la sangre infectada, depositándola entre la meseta y el cubreobjetos para que se difunda por capilaridad, evitando que se formen burbujas o caiga el líquido a los surcos.

Se realiza el recuento de los tripanosomas en los cuatro cuadrantes para leucocitos; se calcula el número de tripanosomas por mm<sup>3</sup>, considerando que cada cuadrante mide 1 mm<sup>2</sup>, y que la altura de la superficie de la meseta (cuadrícula) al cubreobjetos, es de 0.1 mm.

Por lo tanto

$$\frac{\text{N}^\circ \text{ de tripanosomas}}{\text{contados en los 4 cuadrantes}} = \text{Promedio de tripanosomas/mm}^2$$

Para determinar el promedio de tripanosomas en 1 mm<sup>3</sup>, y conociendo que la altura es de 0.1 mm, se considera que 0.1 mm = 1/10 mm.

$$\text{Promedio de tripanosomas por mm}^2 \times 10 = \text{Promedio de tripanosomas por mm}^3$$

Y considerando la dilución de la sangre infectada, al hacer el conteo, fue 1:20, entonces.

Promedio de tripanosomas por  $\text{mm}^3 \times 20 = [ \quad ]$  de tripanosomas por  $\text{mm}^3$  de suspensión inoculada.

Haciendo la conversión a  $\text{cm}^3$  (donde  $1 \text{ cm}^3 = 1 \text{ ml}$ )

Si  $1 \text{ cm} = 1000 \text{ mm}^3$ , entonces  $1 \text{ mm}^3 = 0.001 \text{ cm}^3$

Por lo tanto

$$\begin{aligned} \frac{\text{tripanosomas}}{\text{mm}^3} \times 1 \text{ mm}^3 &= \text{tripanosomas/cm}^3 \\ & \quad \quad \quad 0.001 \text{ cm}^3 \\ &= \text{tripanosomas/ml} \end{aligned}$$

5) Obtención del inóculo de 50,000 tripomastigotes.

Una vez calculada la concentración de tripanosomas/ $\text{mm}^3$ , obtener la mayor cantidad de sangre infectada con *Trypanosoma cruzi*, una vez obtenida, realizar los cálculos necesarios para la obtención de un inóculo de 50,000 tripomastigotes.

Ejemplo

$$[ \quad ] \text{ tripomastigotes/ml}$$

Por lo tanto

$$\begin{aligned} \text{Cantidad de tripomastigotes} & \text{----- Sangre obtenida en ml} \\ 50,000 \text{ Tripomastigotes} & \text{----- X} \end{aligned}$$

X = Cantidad de sangre conteniendo 50,000 tripomastigotes para inocular a cada uno de los ratones no infectados

6) Segunda inoculación a ratones. Con un inóculo de 50,000 tripomastigotes, se inocula un lote de 10 ratones hembras de aproximadamente 20-22 g de peso corporal, por vía intraperitoneal limpiando previamente con alcohol yodado la zona de inoculación y en condiciones de asepsia.

7) Estudio de los niveles de parasitemia.

Realizar el conteo de las formas sanguíneas por cámara de Neubauer a cada uno de los animales, hasta la ausencia de parasitemia circulante. Graficar los resultados.

8) Estudio de la morfología de los tripomastigotes sanguíneos. Tomar una muestra de sangre periférica cada tercer día a cada uno de los animales de experimentación. Realizar una extensión sanguínea y tefir por la técnica de Giemsa y observar en objetivo de inmersión.

9) Determinar a lo largo de la parasitemias los siguientes puntos: período prepatente, pico máximo, duración.

**NOTA:** La metodología antes descrita se siguió individualmente para cada una de las cepas estudiadas.

## **CAPITULO IV**

## 4.1 RESULTADOS

### 4.1.1 CEPA VILLA.

La parasitemia para esta cepa en ratones albinos mostró baja patogenicidad ya que el 90% de estos animales evolucionaron a la fase crónica de la infección (Cuadro 1). La presencia de parásitos se observó al 10º día, alcanzando el pico máximo al 34º día, con una duración de la infección de 55 días (Fig. 1). En todo el curso de la parasitemia se observaron formas sanguíneas anchas y cortas.

### 4.1.2 CEPA PARRA.

Los niveles parasitémicos comenzaron a presentarse a partir del 10º día, caracterizándose por una curva bien definida con un pico máximo en torno al 37º día de la infección (Fig. 2). Mostró baja patogenicidad evolucionando el 80% de los ratones a la fase crónica (Cuadro 2). Durante toda la evolución de la infección que tuvo una duración de 55 días las formas sanguíneas se mantuvieron anchas y cortas

### 4.1.3 CEPA PUGA.

La cepa caracterizada presenta rápida evolución de la parasitemia, considerándose de alta patogenicidad ocasionando una mortalidad del 100% de los animales parasitados al final de la parasitemia (Cuadro 3). El curso de la infección tuvo una duración de 34 días observando la presencia de tripomastigotes sanguíneos al 7º día, hasta alcanzar un pico máximo en los niveles parasitémicos el día 19. Predominando durante la parasitemia las formas sanguíneas anchas y cortas (Fig. 3).

### 4.1.4 CEPA COMPOSTELA.

El curso de la infección para esta cepa fue de 46 días, causando una mortalidad del

70% de los ratones el día 28, por lo cual se considera de alta patogenicidad. El período prepatente fue de 7 días, hasta alcanzar un pico máximo de la parasitemia al 22º día. Observándose durante el curso de la infección tripomastigotes sanguíneos anchos y cortos (Cuadro y Fig 4)



**CUADRO 1.- PARASITEMIA DE 10 RATONES INOCULADOS CON 50,000 TRIPOMASTIGOTES SANGUINEOS DE LA CEPA VILLA DE *T. cruzi*.**

Nº DEL  
EJEMPLAR

TIEMPO (DIAS)

	10	13	16	19	22	25	28	31	34	37	40	43	46	49	52	55
1	200	650	900	1100	2000	2800	4000	6300	7400	5600	3950	2100	1050	500	100	0
2	50	100	450	700	1500	3150	4700	5850	6600	5050	4200	2650	1700	1050	600	0
3	400	700	1100	1200	1800	2550	4100	6350	5000	4150	3050	2100	950	500	500	0
4	0	200	200	350	1200	2400	3450	4950	3550	2800	1850	750	100	0	0	0
5	0	100	350	550	1600	3000	4200	5050	6900	5550	3700	2500	1300	600	200	0
6	100	250	500	600	2050	3600	4650	6200	5500	4050	2850	2100	950	350	0	0
7	300	400	350	700	1600	3000	3950	5000	5450	4550	3500	2550	1850	1100	500	0
8	0	0	0	500	2100	3700	4800	5950	6700	5600	4550	3450	+	+	+	-
9	0	0	100	150	1400	2550	3950	5200	4450	3200	1050	700	300	50	0	0
10	0	50	50	100	1950	2850	3600	5150	4550	3150	1550	850	400	50	50	0
X	105	245	420	595	1720	2960	4140	5600	5610	4370	3025	1975	860	420	180	0

NOTA: LAS CIFRAS EXPRESAN LA CONCENTRACION DE TRIPOMASTIGOTES/mm<sup>3</sup> EN LA SANGRE DEL RATON INFECTADO.

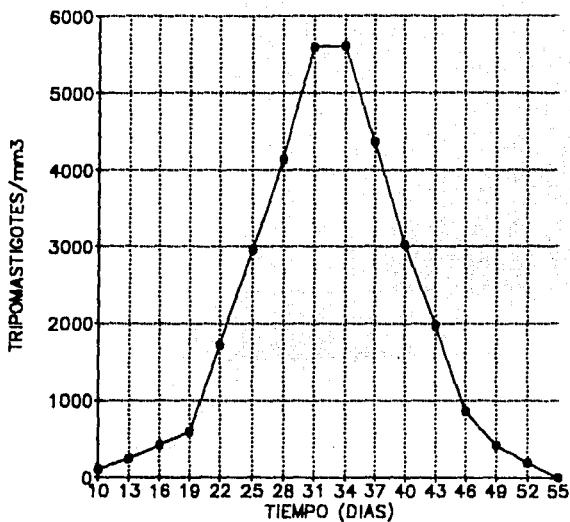


FIGURA 1. CURVA DE PARASITEMIA DE LA CEPA VILLA DE *T. cruzi*  
 Los datos muestran el promedio de la parasitemia de diez ratones,  
 inoculados por vía intraperitoneal con un inóculo de 50,000  
 tripomastigotes

**CUADRO 2.- PARASITEMIAS DE 10 RATONES INOCULADOS CON 50,000 TRIPOMASTIGOTES SANGUINEOS DE LA CEPA PARRA DE *T. cruzi*.**

Nº DEL EJEMPLAR	TIEMPO (DIAS)															
	10	13	16	19	22	25	28	31	34	37	40	43	46	49	52	55
1	0	100	200	350	500	700	1450	2400	3050	4350	2800	1600	1050	450	150	0
2	0	50	400	600	1450	2350	3400	4050	4750	3800	2900	1800	950	450	200	0
3	500	950	1300	2250	2850	3450	3900	4650	3600	2550	1900	1050	450	100	0	0
4	600	900	1150	2150	2950	3550	4450	3150	2500	1850	1050	350	50	0	0	0
5	200	450	500	850	1050	1450	1750	2600	3450	3900	4650	3800	2950	1850	900	0
6	50	100	100	150	550	950	1100	2400	3150	4100	3000	2250	1050	500	100	0
7	0	0	50	100	400	700	1050	1850	2450	3450	4300	2950	1750	850	400	0
8	0	0	0	50	650	1350	1950	2950	3550	4900	3150	2550	1500	550	250	0
9	100	200	250	250	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
10	0	200	350	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
X	145	295	440	675	1040	1450	1905	2435	2650	2890	2375	1635	975	470	200	0

NOTA: LAS CIFRAS EXPRESAN LA CONCENTRACION DE TRIPOMASTIGOTES/mm<sup>3</sup> EN LA SANGRE DEL RATON

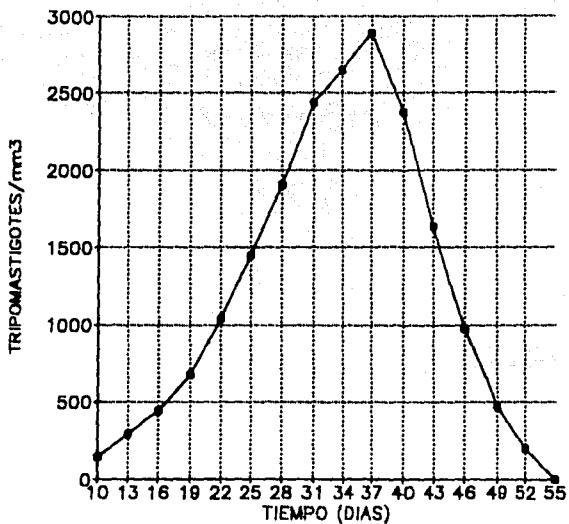


FIGURA 2. CURVA DE PARASITEMIA DE LA CEPA PARRA DE *T. cruzi*  
 Los datos muestran el promedio de la parasitemia de diez ratones,  
 Inoculados por vía Intrapéritoneal con un inóculo de 50,000  
 tripomastigotes

**CUADRO 3.- PARASITEMIA DE 10 RATONES INOCULADOS CON 50,000 TRIPOMASTIGOTES SANGUINEOS DE LA CEPA PUGA DE *T. cruzi*.**

Nº DEL EJEMPLAR	TIEMPO (DIAS)									
	7	10	13	16	19	22	25	28	31	34
1	100	300	850	1450	3000	+	+	+	+	+
2	200	500	900	1700	2900	+	+	+	+	+
3	50	600	900	1350	2450	+	+	+	+	+
4	200	300	550	1200	1800	2100	2950	3400	+	+
5	0	400	600	900	1200	1800	2400	2850	3050	+
6	100	500	500	950	1600	2400	3000	3600	+	+
7	400	1050	1800	2400	3100	+	+	+	+	+
8	50	350	650	1200	2300	+	+	+	+	+
9	0	100	200	600	1050	1600	2300	3000	3400	+
10	350	700	1400	1850	2950	+	+	+	+	+
X	145	480	835	1360	2235	790	1065	1600	645	+

NOTA: LAS CIFRAS EXPRESAN LA CONCENTRACION DE TRIPOMASTIGOTES/mm<sup>3</sup> EN LA SANGRE DEL RATON INFECTADO.

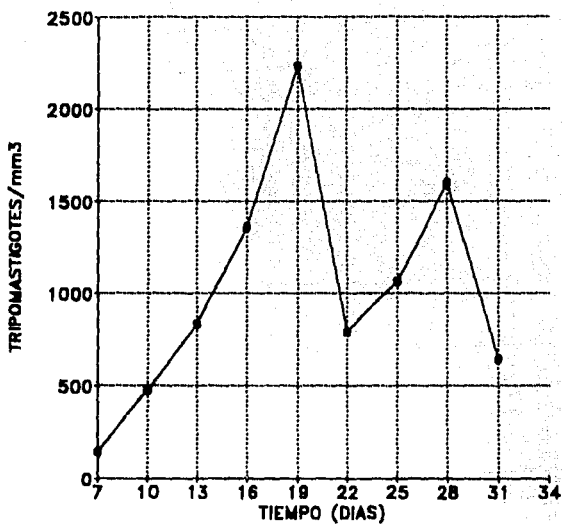


FIGURA 3. CURVA DE PARASITEMIA DE LA CEPA PUGA DE *T. cruzi*  
 Los datos muestran el promedio de la parasitemia de diez ratones,  
 Inoculados por vía intraperitoneal con un inóculo de 50,000  
 tripomastigotes

**CUADRO 4.- PARASITEMIA DE 10 RATONES INOCULADOS CON 50,000 TRIPOMASTIGOTES SANGUINEOS DE LA CEPA COMPOSTELA DE *T. cruzi*.**

Nº DEL EJEMPLAR	TIEMPO (DÍAS)													
	7	10	13	16	19	22	25	28	31	34	37	40	43	46
1	400	700	1500	1900	3500	4800	6500	+	+	+	+	+	+	+
2	1050	2300	3050	4450	5150	7100	+	+	+	+	+	+	+	+
3	800	1400	1700	2300	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
4	0	150	600	900	1600	2600	3000	3900	+	+	+	+	+	+
5	850	1700	2100	3050	4250	4450	4650	4850	-	-	+	+	+	+
6	200	450	700	1300	1400	1400	1900	2950	3900	6000	6600	8500	9400	+
7	200	300	400	1600	3500	4800	+	-	-	+	+	+	-	+
8	900	1600	3550	4150	5200	6600	+	-	-	+	+	+	+	+
9	400	650	1550	1700	3450	4650	5700	7000	-	+	+	+	-	+
10	900	1750	2600	3400	4950	6900	+	-	+	+	+	+	+	+
X	570	1100	1770	2855	3300	4330	2175	2850	390	600	660	850	940	+

NOTA: LAS CIFRAS EXPRESAN LA CONCENTRACION DE TRIPOMASTIGOTES/mm<sup>3</sup> EN LA SANGRE DEL RATON INFECTADO

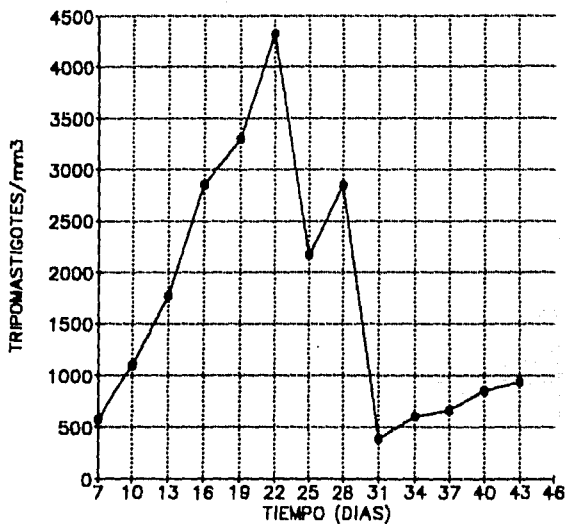


FIGURA 4. CURVA DE PARASITEMIA DE LA CEPA COMPOSTELA DE *T. cruzi*  
 Los datos muestran el promedio de la parasitemia de diez ratones, inoculados por vía intraperitoneal con un inóculo de 50,000 tripomastigotes



## 4.2 DISCUSION

La caracterización de cepas y/o clones es un aspecto importante dentro del estudio básico de la enfermedad de Chagas (Brenner, 1985). Por tal motivo al ser aisladas cuatro cepas (VILLA, PARRA, PUGA y COMPOSTELA) de *Trypanosoma cruzi* en el estado de Nayarit, es necesario conocer algunos aspectos importantes de su comportamiento, mediante una caracterización biológica

Lo anterior se realizó empleando ratones albinos (hembras) de la cepa NIH, inoculados por vía intraperitoneal con un inoculo de 50,000 tripomastigotes, mientras que la observación y seguimiento de la parasitemia se practicó tomando muestras de sangre cada tercer día obtenidas por punción en la vena caudal. Se realizó la cuenta de tripomastigotes en cámara de Neubauer para obtener resultados lo más precisos y exactos que nos fuera posible (Perlowagora, 1982)

Los Cuadros 1, 2, 3 y 4 muestran los promedios de las lecturas realizadas a los lotes de ratones infectados con las cepas estudiadas. El periodo prepatente tuvo una duración de siete días para las cepas PUGA y COMPOSTELA, variando solo en tres días para las cepas VILLA y PUGA que tuvo una duración de diez días

Hay numerosos factores que pueden influir en la aparición de los primeros tripanosomas en la sangre circulante. Uno de ellos es la vía de inoculación, no obstante que no hay una absoluta concordancia entre los autores, pues mientras unos dicen (Galliard, 1930 y 1952) que la vía de inoculación subcutánea debe preferirse porque los tripanosomas aparecen rápidamente y en número mayor, otros consideran (Chagas, 1909) que la peritoneal es la que produce infecciones más elevadas y mortales, mientras que la ruta oral tiende a producir el mayor número de localizaciones viscerales (Avilés y Ríos, 1950).

Son de tomarse en cuenta también la resistencia del animal, el poder infeccioso, la virulencia de la cepa y el número de parásitos inoculados, considerando de gran importancia para la intensidad de la infección que se logra, el tamaño del inoculo (Díaz,

1934), así como el que se inyecte un cierto número de parásitos mínimo para producir alta mortalidad (Goble, 1951). Otros sostienen (Mazzotti, 1940) que pequeñas variaciones en la dosis del inóculo no son de importancia para la infección producida, dependiendo más bien de la cepa inoculada y de variaciones individuales del huésped.

El estudio del polimorfismo de tripomastigotes sanguíneos de las cuatro cepas (VILLA, PARRA, PUGA Y COMPOSTELA) de *Trypanosoma cruzi* reveló un patrón morfológico semejante en todas ellas, con un nítido predominio de las formas anchas y cortas, durante todo el período de observación.

Brumpt (1912) opina que las formas gruesas representan formas evolutivas más viejas que derivan de las formas delgadas las cuales son más jóvenes.

Para Meyer y Oliveira (1948) el rompimiento precoz de las células parasitadas libera formas delgadas, en cambio la presencia prolongada de los tripomastigotes en las células da origen a formas gruesas.

La amplia distribución geográfica de *T. cruzi* así como la gran variedad de huéspedes y vectores seguramente han favorecido la selección de cepas que varía en morfología para los animales experimentales y quizá para el hombre, pues algunas cepas presentan fundamentalmente tripomastigotes sanguíneos delgados, mientras que otras presentan formas sanguíneas gruesas (Brener, 1977).

En México, muchas cepas presentan únicamente un tipo de tripomastigotes sanguíneos en el curso de toda la infección, (Cervantes Cortez A, 1981) y en esto se diferencian de la mayoría de las cepas sudamericanas.

Estos datos sugieren que este patrón morfológico puede ser dominante en cepas de *T. cruzi* del área o país y representa una característica de distribución regional localizada.

En este sentido, Andrade, Brodskin & Andrade (1983) mencionaron que cada área geográfica parece tener un mismo tipo de cepa y Andrade (1974) demostró que las cepas aisladas de Bahía (Brasil) exhiben predominio de formas largas.

A su vez, las cepas que presentan predominio de formas largas desde la fase inicial de la infección generalmente exhiben un patrón único de curva de parasitemia, con ascenso lento y gradual, picos máximos entre 20 y 30 días, seguido de una disminución también lenta del número de tripomastigotes y con mortalidad muy variable: Este comportamiento fue observado en numerosas cepas de *T. cruzi* analizadas por varios autores (Brener, 1965; Andrade, 1974; Carneiro, 1982; Schlemper Jr, 1982). Estos datos establecen la existencia de la relación entre el patrón morfológico-evolutivo de los parásitos y el curso de la infección experimental.

En un estudio parasitológico amplio hecho por Melo y Brener (1978), describen diversos modelos morfológicos de las formas sanguíneas de *T. cruzi* y los relacionan con las curvas de parasitemia observadas en huéspedes infectados.

Las Figuras 1,2,3, y 4 muestran las curvas de parasitemia de las diferentes cepas estudiadas de *T. cruzi*.

Las cepas VILLA y PARRA presentan el mismo modelo de parasitemia, con un incremento gradual hasta alcanzar un pico máximo los días 34 y 37 respectivamente; posteriormente con una declinación gradual de la concentración de tripomastigotes sanguíneos, observándose un periodo largo de la infección de 55 días

Las cepas PUGA y COMPOSTELA presentan un modelo de parasitemia diferente con un aumento de la parasitemia hasta llegar a su pico máximo los días 19 y 22, caracterizadas con un repentino incremento el día 28 hasta un descenso de la infección .

que para la cepa PUGA tuvo una duración de 34 días. Sin embargo para la cepa COMPOSTELA el día 34 hubo un repentino incremento hasta el día 43 de la infección y sufriendo después una declinación muy marcada.

El registro de patogenidad que se obtuvo fue similar para las cepas VILLA y PARRA, ya que el 90 y 80% de los animales pasaron a la fase crónica de la infección considerándose de baja patogenidad. Sin embargo para las cepas PUGA y COMPOSTELA provocaron una mortalidad del 80 y 90% de los animales parasitados respectivamente. Sin embargo la virulencia registrada para las cuatro cepas fueron similares, debido a que los niveles parasitémicos alcanzados se relacionan para las cuatro cepas estudiadas durante toda la infección.

La variación en virulencia está influenciada por factores muy diversos, cuya naturaleza y efectos no son conocidos aún de modo exacto. Mientras que unos autores opinan que pases a través de animales sensibles atenúan la virulencia de una cepa y la readquiere cuando se inocula a otra especie animal (Chagas, 1909; Gaillard, 1952; Díaz, 1934),, otros autores han trabajado con cepas muy viejas manteniéndolas en el laboratorio en animales y cultivos que, sin embargo, muestran extrema patogenidad para las ratas jóvenes.

Se ha considerado que en el mismo huésped invertebrado y bajo condiciones climáticas semejantes *T. cruzi* presenta diferentes virulencias, creyendo que dependen de la especie de huésped vertebrado, así como de las condiciones ecológicas (Mazzotti, 1940).

La patogenidad y la virulencia son características intrínsecas y pueden o no ocurrir simultáneamente, y deben ser bien definidas con respecto al comportamiento de *T. cruzi*.

Virulencia es la capacidad del parásito de multiplicarse dentro del huésped de experimentación. Patogenicidad es la capacidad de producir lesiones o mortalidad en los animales de experimentación (Andrade, 1985).

Las cepas varían en su patogenicidad y su virulencia ya que no tienen el mismo comportamiento en huéspedes diferentes.

Tomando en cuenta diversos parámetros como son la morfología del parásito en sangre periférica del ratón, patogenicidad y virulencia fueron establecidos tres tipos caracterizados como sigue:

TIPO I : Cepas con una multiplicación rápida y con una parasitemia alta de 7 a 12 días de infección y un 100% de mortalidad con predominancia de formas delgadas en la fase aguda de la infección.

TIPO II : Cepas con una multiplicación media y con un pico muy irregular en la parasitemia de 12 a 20 días de infección, con una mortalidad baja y con predominancia de las formas gruesas y pocas formas delgadas durante la fase inicial.

TIPO III : Cepas con una multiplicación lenta y con un pico alto en la parasitemia de 20 a 30 días de la infección, con un rango bajo de mortalidad a los 50 días de infección, con predominancia de formas gruesas en todo el curso de la infección.

(Andrade, 1974)

Tomando en cuenta la caracterización realizada por Andrade (1974) y las características similares encontradas en las cepas estudiadas se pudo determinar que las cepas VILLA y PARRA, pertenecen al TIPO III, debido a que el pico máximo lo alcanzaron aproximadamente entre el 30-34º día observándose baja mortalidad y un patrón morfológico constante durante toda la parasitemia

En cambio las cepas PUGA y COMPOSTELA pertenecen al TIPO I, debido a su alta mortalidad y su rápida multiplicación del parásito.

## CAPITULO V

## CONCLUSIONES

- Para las cepas PARRA, VILLA, PUGA y COMPOSTELA, no se presentaron cambios morfológicos durante el curso de la parasitemia.
- En las cuatro cepas estudiadas se presentó el mismo patrón morfológico, observándose el predominio de las formas anchas y cortas durante la infección.
- No existe relación entre el patrón morfológico y el curso de la infección, representado en las curvas de parasitemia para las cepas VILLA, PUGA, PARRA y COMPOSTELA.
- La morfología no es un factor determinante para clasificar a las cepas estudiadas.
- En las cepas observadas no existe relación entre virulencia y mortalidad de los animales de experimentación.



## BIBLIOGRAFIA

- 1.- Agosin M; Badinez O. Algunas características de la infestación con *Trypa nosoma cruzi* en el conejo. Revista Biológica Fas 8 11-31: 1948.
- 2.- Andrade V; Andrade S.G, Barral Netto M. Avaliacao do comportamento de diferentes cepas de *Trypanosoma cruzi* na infección de seis linhagens isogenicas de comundongos. Rev. Soc. Bras. Med. Trop 18 143-154, 1985
- 3.- Andrade V. Brodskin C. & Andrade S.G Correlation between isoenzyme patterns and biological behaviour of different strains of *Trypanosoma cruzi* Rev. Soc. Trop. Med. Hyg. 77: 796-799, 1983.
- 4.- Andrade S.G. Carneiro M. Caracterizacao biológica de amostras de *Trypanosoma cruzi* de diferentes zimodemas e esquizodemas. Tese UFMG. 90pp 1982.
- 5.- Andrade S.G. Caracterizacao de cepas de *Trypanosoma cruzi* isoladas no Reconcavo Bahiano Rev. Pat. Trop 3 65-121, 1974
- 6.- Aviles F.M. y T. Rios Rev. Ecuat. De Hig. y Med. Trop. Guayaquil. VII, 84-90, 1950.
- 7.- Badinez O. Contribución a la anatomia patológica de la enfermedad de Chagas experimental. Revista Biológica Fas 3: 3-52 1945.
- 8.- Bice E.D and Zeledón R Comparison of infectivity of strains of *T. Cruzi*. J. Parasitol. 56: 663-670: 1970
- 9.- Brener Z. Lye cycle of *T. Cruzi* Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo. 13: 171-178 1971.
- 10.- Brener Zigman. Simposio sobre nuevos enfoques en la investigación de la tripanosomiasis americana. Organización Panamericana de la Salud. Belo Horizonte. Minas Gerais. Brasil. 21 de Marzo de 1975.
- 11.- Brener Z. General review on *T. Cruzi*. Classification and taxonomy. Rev. Soc. Bras. Med. Trop. 18: 1-8. 1985.
- 12.- Braun M. De Tito E. Respuesta inmune al *Trypanosoma cruzi*. Un enfoque de patogenia en la enfermedad de Chagas. Acta Physio. Pharmacol. Latinoam. 35: 1-47: 1985.

- 13.- Brener. Comparative studies of different strains of *Trypanosoma cruzi* on the blood-stream of normal and immune mice. Ann. Trop. Med. Parasitol. 63: 215-220, 1965.
- 14.- Brumpt E. Le *Trypanosoma cruzi* evolue chez *Conorhinus rnegistus*, *Cimex lectulariu*, *Cimex boueti* e *Ornithodoros nouabata*. Bull. Soc. Path. 5: 360-367 1912.
- 15.- Carrada-Bravo T. Trypanosomiasis Americana de Chagas. Bol. Med. Hosp. Infant. Mex. 40(8): 408-416. 1983.
- 16.- Cárdenas Ramírez L. Tay J. y Salazar P.M. Cambios histológicos producidos en el ratón por cepa mexicana de *Trypanosoma cruzi*. Rev. Inv. Sal. Pub. México 35: 131-153, 1975
- 17.- Chagas C. Mem. Inst. Osw. Cruz. 159. 2-18, 1909
- 18.- Diaz E. Mem. Inst. Osw. Cruz. XXVIII: 1-110, 1934.
- 19.- Galliard H. Ann. Paras. Hum. et Comp VII: 140-142, 1930. Ibid. XXVI, 1952.
- 20.- Goble F.C. J. Parasitol. XXXVII 408-414, 1951.
- 21.- Kumate J. Gutiérrez G. Muñoz O. Santos J. Manual de Infectología. Editorial Méndez Cervantes. México, D.F.: 1990
- 22.- Lambrecht T. L. Biological variations in tripanosomes and their relations to the epidemiology of Chagas disease. Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo 7: 346-352, 1965.
- 23.- Martínez M. De L. Martín E. Una nueva cepa de *Trypanosoma cruzi*, con localización peritoneal preferente. Sal. Pùb. Mèx. 23(3): 23-24, 1981.
- 24.- Mazzott L. Rev. Inst. Salub. Enf. Trop. I 73-78 1940.
- 25.- Melo R.C. & Brener. Tissue tropism of different *Trypanosoma cruzi* strains. J. Parasitol. 64: 473-482, 1978.
- 26.- Meyer H. and M. Oliveira. Cultivation of *Trypanosoma cruzi* in tissue culture: a four year study. Parasitology 39. 91-94, 1948.
- 27.- Nogueira N. Chaplan S. And Cohn Z. *Trypanosoma cruzi*. Factors modifying ingestion and fate of blood forms tripomastigotes. Journal of Experimental Medicine. 152: 447-451, 1980.
- 28.- Pifano F. Aspectos en el comportamiento del *Schizotrypanum cruzi* en el vertebrado. Arch. Ven. Med. Trop. y Parasitol. Méd 5(1) 69-93, 1965.

- 29.- Pinto D. Acute Chagas disease. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. Suppl 79: 85-91, 1984.
- 30.- Pinto D. Doença de Chagas Clínica e Terapêutica, Ministério de Saúde, Sao Paulo Brazil, 1990.
- 31.- Romero Dávalos Alfredo. Enfermedad de Chagas. Editorial CIB. 1ª Edición Bolivia, 1978.
- 32.- Salazar S.P.M. et al. Comportamiento en el ratón de una cepa mexicana de *Trypanosoma cruzi* de peculiar virulencia. Rev. Inv. Sal. Pùb. México. 35: 37-45, 1975
- 33.- Schiemper JR. Caracterizacáo de cepas do *Trypanosoma cruzi* isoladas de pacientes com diferentes formas clinicas da doença de Chagas. Tese. UFRJ 131pp, 1982.
- 34.- Tay J. et al. Estudio sobre seis cepas mexicana de *Trypanosoma cruzi*. Rev. Inv. Sal. Pùb. México. 33: 67-76, 1973.
- 35.- Tay J. La Enfermedad de Chagas on la República Mexicana. Sal. Publ. Mèx. XXII: 409-450, 1980.
- 36.- Tay. Lara Velasco. Gutiérrez. Parasitologia Medica Editorial Méndez Cervantes. México. D.F. 1981.
- 37.- Velasco-Castrejón. O. C. Guzmán. Importancia de la enfermedad dw Chagas en México. Rev. Lat-amer. Micro. 28: 275-283 1986
- 38.- Velasco, CO. y cols. La enfermedad de Chagas. Boletín técnico N° 8. Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicas S A México 1991.
- 39.- W.H.O. World Health Organizations. Report of meeting on the standardization of methods for *Trypanosoma cruzi* classification. TDR/EPICHA-TCC/85 3: 1-4. 1985.