

29.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUIMICA



EXAMENES PROFESIONALES
FAC. DE QUIMICA

COMPORTAMIENTO *in vitro* e *in vivo* DE CLONAS DE
Trypanosoma cruzi OBTENIDAS DE AISLADOS
MEXICANOS.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA
P R E S E N T A :
LUZ MARIA HERNANDEZ GONZALEZ



MEXICO, D. F.

260324

1998

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



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 esta 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.

JURADO ASIGNADO

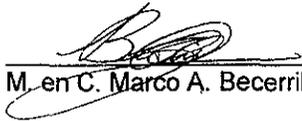
Presidente	Prof. Velasco Castrejón Oscar.
Vocal	Prof. León Chapa Saturnino de.
Secretario	Prof. Becerril Flores Marco Antonio.
1er. suplente	Prof. Tsuzuki Reyes María Guadalupe.
2do. suplente	Prof. Paniagua Solís Jorge Fernando.

Sitio donde se desarrolló el tema:

Laboratorio de Biología de Parásitos. Departamento de Microbiología y
Parasitología

Facultad de Medicina, U.N.A.M.

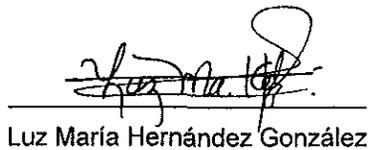
Asesor del Tema


M. en C. Marco A. Becerril Flores

Supervisora Técnica


Dra. Paz María Salazar Schettino

Sustentante


Luz María Hernández González

Los hombres inteligentes quieren
aprender, los demás quieren enseñar.

Anton Chejov

DEDICATORIAS

A la Dra. Paz María Salazar Schettino:

Por haberme brindado la oportunidad de
realizar este proyecto en su laboratorio y
por el apoyo recibido.

A Marco Antonio Becerril:

Por su paciencia, tiempo y conocimientos
brindados para la realización de este
trabajo. Gracias por ofrecerme también
tu amistad.

A todos los integrantes del
laboratorio de Biología de
parásitos:

Por aceptarme durante un año
como parte de su equipo y ahora
como amiga.

A todos ellos ¡Gracias!

A mis Padres:

Doy gracias a Dios por darme la oportunidad de tener a mi lado a personas tan valiosas como ustedes, esto es solo una pequeña parte de todas las cosas maravillosas que he recibido.

Los quiero, admiro y respeto y siempre serán mi mayor tesoro.

A mis Hermanos:

*Bertha, Guille, Héctor, Gris, Carmen y Javier:
Sus Consejos, Cariño y Apoyo me han motivado a luchar siempre para conseguir las cosas que quiero.
Gracias por digerir mis cambios como persona y aceptarme como SOY.*

*Esto es tan mío como suyo.
Los Amo.*

A mis Sobrinos:

*Laura, Karla, J. Oscar, Daniela, María
Fernanda y Jaimito:*

Esperando que sepan valorar las oportunidades que la vida les da y porque algún día tengan de cada uno de ustedes un ejemplar como éste.

┌ A Liz, Steffhan y Vivian: ┐

A quienes considero una parte importante de mi, pero muy especialmente a ti Liz por todas las cosas que hemos compartido y porque a través de todos estos años me haz demostrado que aún es posible encontrar la verdadera
AMISTAD.

┌ A Alejandro Ahumada: ┐

Te debo en gran medida el haber seguido adelante y poder cumplir ahora con una de las metas más importantes de mi vida.

Me da gusto saber que el tiempo no ha sido un obstáculo para que puedas compartir conmigo este logro y tu valiosa AMISTAD.

Porque existen en la vida cosas que
afortunadamente no pueden ser medidas en
tiempo o cantidad, pero si en calidad.

Con cariño para Ustedes:
Jaime Rodríguez, Beatriz Vargas,
Elide Hernández, Carlos Mena,
Nancy Monroy, Luciano
Hernández, María Antonieta,
Mariano Pineda y Luis Sánchez.

Gracias por brindarme su
AMISTAD.

Y creo que finalmente, a todas las
personas que directa o indirectamente
me apoyaron a lo largo de mi VIDA,
solo me queda decirles
MIL GRACIAS.

Luz María Hernández González.

INDICE

INDICE

ANTECEDENTES.	1
I. Importancia en salud pública.	2
2. Biología del parásito.	5
2.1 Fases de <i>T. cruzi</i>	5
a) Tripomastigote.	6
b) Epimastigote.	6
c) Amastigote.	6
2.2 Ciclo Biológico.	7
3. Heterogeneidad de <i>T. cruzi</i> .	9
3.1 Variaciones inter e intra cepas.	10
3.2 Variabilidad en aislados mexicanos de <i>T. cruzi</i> .	11
3.3 Comportamiento Biológico <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> .	12
3.4 Patrones Moleculares.	13
HIPÓTESIS.	16
OBJETIVOS.	18
MATERIAL Y MÉTODOS.	20
1. Clonación de <i>T. cruzi</i>	21
2. Reproducción de clonas <i>in vitro</i> .	24
3. Congelamiento de las clonas.	24
4. Determinación del comportamiento de clonas <i>in vitro</i>	25
5. Determinación del comportamiento de clonas <i>in vivo</i>	26

RESULTADOS.	27
Rendimiento de la clonación.	28
Selección de la cepa de ratón para determinar el comportamiento <i>in vivo</i> de las clonas	30
Determinación del comportamiento <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i>	32
Determinación del comportamiento <i>in vivo</i> de las clonas	32
Porcentaje de sobrevivencia	37
Determinación del comportamiento <i>in vitro</i> de las clonas	41
DISCUSIÓN	45
CONCLUSIONES	49
APÉNDICE.	51
BIBLIOGRAFÍA.	56

ANTECEDENTES

ANTECEDENTES

I. IMPORTANCIA EN SALUD PÚBLICA.

La enfermedad de chagas es uno de los padecimientos más importantes en América Latina. De acuerdo con los reportes de la Organización Mundial de la Salud (OMS), existen alrededor de 16 a 18 millones de personas infectadas en el continente y 70 millones se encuentran en riesgo de infección.¹ En México, las tres cuartas partes del país son consideradas zonas endémicas con base en los resultados de las encuestas seroepidemiológicas realizadas a la fecha.² Se calcula que hay aproximadamente tres millones de individuos infectados. Los estados reportados con mayor número de casos son Sonora, Oaxaca, Veracruz, Estado de México, Nayarit, Sinaloa, Jalisco, Yucatán, Guerrero, Michoacán, Zacatecas, Chiapas y Morelos.³

(fig. 1).

Trypanosoma cruzi, el agente causal de la enfermedad de Chagas, es un protozoo flagelado, en su ciclo biológico se encuentran involucrados mamíferos incluyendo el hombre y a otros que se comportan como reservorios y chinches hematófagos denominados triatóminos que actúan como transmisores del parásito. En el humano, la localización más frecuente del parásito es en el bazo, hígado, ganglios linfáticos, cerebro y músculo y los órganos más afectados son el corazón, esófago, colon y en general las vísceras huecas.⁴

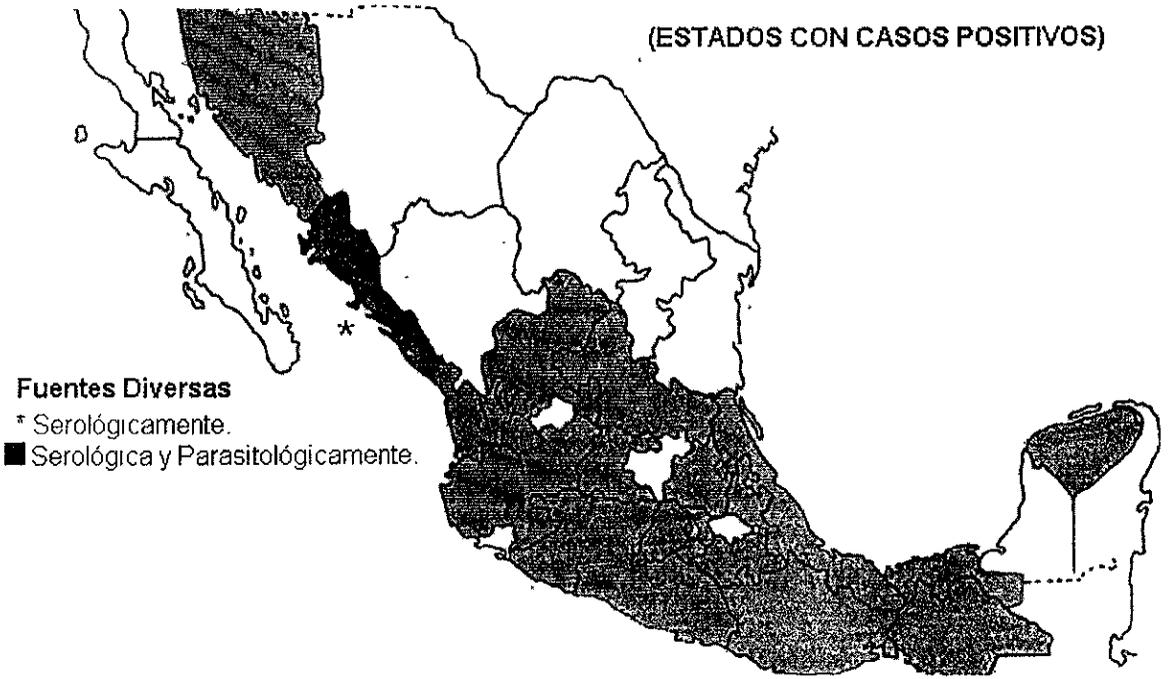


Fig. 1 Distribución de la Enfermedad de Chagas
En México. (Tomado de Velasco, 1986)

Las personas infectadas por *T. cruzi* cursan por tres etapas: aguda, de latencia o indeterminada y crónica. Cuando la fase aguda es sintomática se presenta fiebre elevada intermitente, hepatoesplenomegalia, crecimiento de ganglios linfáticos y más comúnmente un signo de puerta de entrada llamado chagoma de inoculación que habitualmente se produce en el sitio de la picadura y el signo de Romaña, que es un edema bpalpebral, unilateral indurado de color violáceo; esta fase dura de 2 a 4 meses. La etapa indeterminada suele durar de 10 a 20 años, en ella no se presenta sintomatología aunque el infectado es seropositivo. Entre un 60 a 70 % de los infectados no van a padecer la enfermedad mientras que los restantes pasan a la fase crónica que se caracteriza por miocarditis, insuficiencia cardíaca progresiva, mega vísceras principalmente digestivas y muerte súbita.^{2,5}

2. BIOLOGÍA DEL PARÁSITO

T. cruzi es un organismo que presenta diferentes fases a lo largo de su ciclo biológico. La identificación de éstas se basa en criterios morfológicos, como es la posición, respecto al núcleo, de una estructura denominada cinetoplasto y el lugar de donde emerge el flagelo. ⁷ Los tres principales estadios son denominados tripomastigote, epimastigote y amastigote.

2.1 FASES DE *T. cruzi*

a) El tripomastigote mide aproximadamente 20 μm de largo y 2 μm de ancho, está constituido por un cinetoplasto que se localiza en el extremo posterior del protozoario; de aquí surge un flagelo que forma una membrana ondulante a lo largo de todo el parásito. ⁷ Este estadio no se multiplica, pero es la forma infectante (tripomastigote metacíclico) y se le encuentra tanto en la sangre de los mamíferos como en el intestino posterior de los triatóminos.

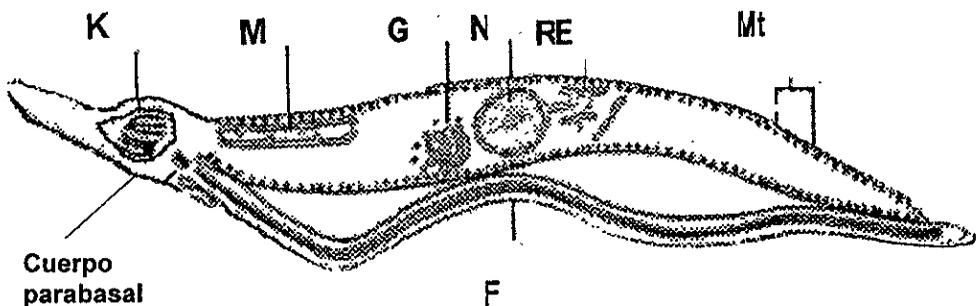


Fig. 2 Representación de la ultraestructura de un tripomastigote de *T. cruzi* K cinetoplasto, M mitocondria, G aparato de Golgi, N núcleo, RE retículo endoplasmico, Mt microtúbulos subpeculiares, F flagelo.
(Tomado de Wyler, 1993)

b) En etapa de epimastigote el parásito mide 20-25 μm de largo, el cinetoplasto se encuentra localizado sobre el núcleo, tiene una pequeña membrana ondulante y un flagelo libre. Esta fase se encuentra en los medios de cultivo y en el intestino medio de los triatóminos; en este estadio el parásito se reproduce extracelularmente.⁷ (figura 3)

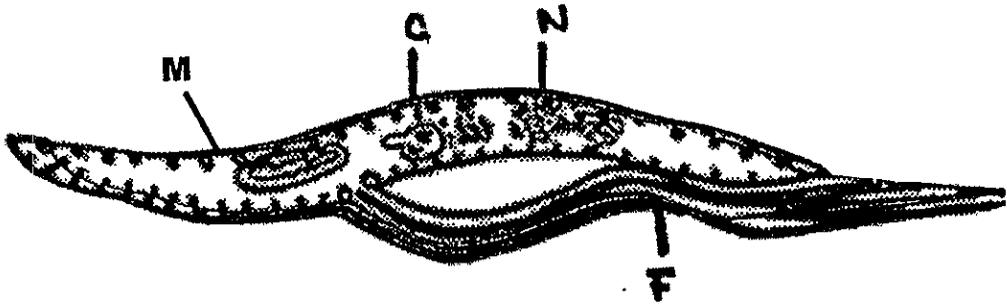


Fig. 3 Representación de la ultraestructura de Epimastigote de *T. cruzi* C cinetoplasto N núcleo, F flagelo. M. mitocondria: (Tomado de Wyler, 1993)

c) El amastigote es una estructura ovoide que mide 2-6 μm de diámetro en la que se observa un axonema en lugar de un flagelo además del cinetoplasto y el núcleo; se multiplica intracelularmente por fisión binaria. (figura 4)

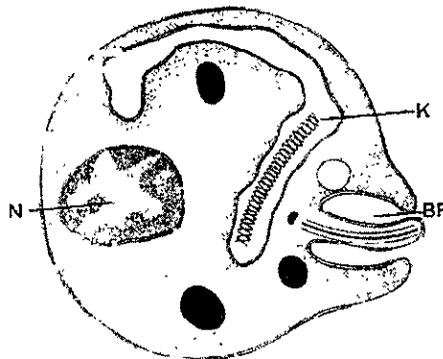


Fig. 4 Representación de la ultraestructura de Amastigote de *T. cruzi* K cinetoplasto, N núcleo y BF bolsa flagelar (axonema) (Tomado de Wyler, 1993)

2.2 CICLO BIOLÓGICO

Los triatóminos se infectan con el protozooario cuando pican un huésped vertebrado con tripomastigotes en la sangre; éstos pasan al intestino medio del insecto donde se transforman a epimastigotes y se multiplican activamente por fisión binaria longitudinal; ² transcurrido un período que oscila entre diez a treinta días, los parásitos se localizan en el intestino posterior en donde se convierten en tripomastigotes metacíclicos, formas infectantes para el huésped vertebrado. Cuando el transmisor se alimenta de un mamífero no infectado, junto con sus deyecciones elimina al parásito, el cual penetra por la piel o mucosas o por el orificio que deja la picadura. Una vez dentro, el parásito infecta las células adyacentes al sitio de entrada y en el citoplasma de aquellas se transforma en fase de amastigote, el cual se divide por fisión binaria durante repetidas ocasiones cuyo movimiento activo ocasiona la lisis de la célula huésped para liberarse e infectar otras células adyacentes, o bien se dirigen por circulación sanguínea a otros órganos, principalmente aquellos con tejido muscular. Los parásitos presentes en este huésped con parasitemia infectan a triatóminos cuando éstos se alimentan de aquél. ^{7,8,9,10,11}

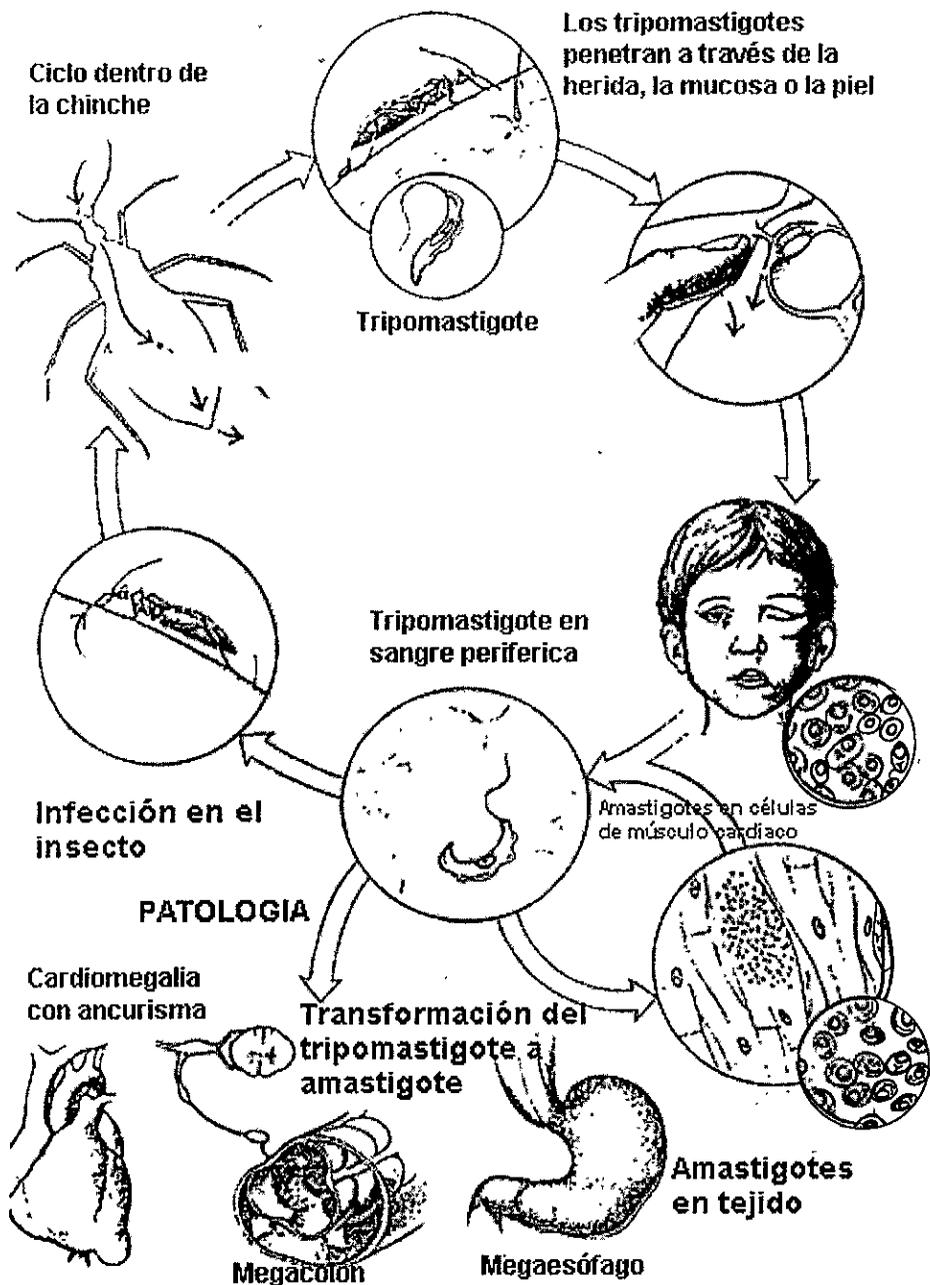


Fig. 5 Ciclo de vida de *T. cruzi*. (Tomado de Katz, 1988)

3. HETEROGENEIDAD DE *T cruzi*

Uno de los problemas que no se ha podido explicar claramente en la enfermedad de Chagas, es la variabilidad en las manifestaciones clínicas que se presenta en la población infectada, que va desde la asintomatología hasta la muerte. Para explicar la diversidad, Lambrecht postuló la premisa de que en la naturaleza el agente causal puede estar constituido por subpoblaciones genéticamente heterogéneas que además difieren en virulencia y por tanto modulan el proceso de la enfermedad ^{12,13}.

Los diferentes ambientes en que se encuentra una población de *T. cruzi* dan origen a selectividad de subpoblaciones que la constituyen, cuando se adaptan a un medio específico. Actualmente está demostrado que la heterogeneidad del protozoario se presenta inter e intrapoblacional mediante diversas técnicas: patrones isoenzimáticos, esquizodémicos, antigénicos, contenido total de DNA, crecimiento en medios de cultivos y patogenicidad en ratón. ^{14,15,16,17,18}

3.1 Variaciones Inter e Intra Cepas

Las poblaciones de *T. cruzi* reciben diferentes nombres dependiendo de su origen, se les denomina "aislados" cuando se han obtenido a partir de un huésped o transmisor y que aún no han sido caracterizadas;^{14A} "cepa" cuando se refiere a una población homogénea que posee un grupo de características definidas;^{15A} "stock" a una población que se ha guardado en un laboratorio mediante su mantenimiento en animales experimentales o medios de cultivo;^{14A} y "clona" a la población que proviene de una célula con características genéticas idénticas transmitidas a su descendencia.^{16A}

Un ejemplo de estudios que demuestran variabilidad tanto intra como interpoblacional es el de Engman y cols. (1987), en el que al trabajar con dos cepas obtenidas de distintas zonas geográficas (Miranda y Silvio - X10), observaron que presentaban diferente patrón de cariotipos obtenidos mediante electroforesis de alternación de campo ortogonal (OFAGE) y a su vez los patrones de las clones pertenecientes a cada una de las dos cepas presentaban diferencias¹³. Otro estudio es el de Lima y cols. en que a partir de una cepa altamente infectiva (CL), obtienen una clona (CL - 14), la cual no produce parasitemia ni mortalidad en ratones, a diferencia de la cepa completa que produce parasitemia y significativa mortalidad¹⁹.

3.2 Variabilidad en aislados mexicanos de *T. cruzi*.

En la República Mexicana se han efectuado estudios de laboratorio sobre el comportamiento de diversas cepas de *T. cruzi* aisladas de diferentes regiones del país. Con algunas de ellas se han realizado estudios experimentales infectando ratones en los que se ha determinado las parasitemias que producen y el tropismo que desarrollan hacia diversos tejidos y órganos, así como el daño provocado en ellos. Estos trabajos fueron realizados inicialmente por Mazzotti, Tay y Pérez Reyes. Los resultados con dichas observaciones ponen de manifiesto las variaciones que se observan entre las diversas cepas que han sido aisladas^{20,21}. Tay, trabajando con seis aislados obtenidos de distintas zonas, cinco de ellos a partir de triatóminos y uno de un caso humano, demuestra que existe variabilidad *in vivo* entre ellas y que la cepa "Jojutla", aislada del humano, fue la que mostró mayor virulencia observada por las parasitemias presentadas en el ratón y la invasión de órganos por la presencia de nidos de amastigotes.²²

En 1978, Salazar y cols. (1978), durante un estudio epidemiológico sobre enfermedad de Chagas en Jalisco, aislaron cuatro cepas de *T. cruzi*. Una de ellas se aisló de un caso humano y las otras tres a partir de las deyecciones de ejemplares de *Triatoma barberi*. Con las cuatro cepas se determinó la parasitemia que se produce en el ratón así como su patogenicidad e invasión tisular. La cepa que presentó mayor virulencia fue la aislada del humano, seguida de una obtenida del transmisor en la misma localidad donde se presentó el caso humano²³.

3.3 Comportamiento Biológico *in vivo* e *in vitro*

Las diferencias en el comportamiento *in vivo* e *in vitro* han sido reportadas por diversos autores, la variabilidad interclonal es evidente en estudios con ratones infectados, demostrando diferentes curvas de parasitemia y mortalidad ocasionadas por *T. cruzi*.²⁴ Bice, Zeledón y cols. (1970), trabajando con cinco cepas de *T. cruzi* aisladas de Costa Rica provenientes de diversos huéspedes y vectores, comparan la infectividad y el histotropismo. Las cinco cepas mostraron variaciones en el grado de parasitemia y número de nidos de amastigotes producidos; todas las cepas fueron miotrópicas pero mostraron diferencias en la invasión a diferentes tejidos.²⁵ Otros estudios *in vitro* también demuestran heterogeneidad respecto al tiempo de generación y por tanto velocidad de crecimiento en el medio de cultivo LIT entre distintas cepas y aún con distintas clonas de la misma cepa.²⁴

3.4 PATRONES MOLECULARES

En los últimos 20 años se han realizado estudios a cerca de las características moleculares de *T. cruzi*, entre estos se encuentran las caracterizaciones con isoenzimas que son moléculas que difieren estructuralmente pero presentan las mismas propiedades catalíticas de una enzima, por lo que se pueden identificar electroforéticamente gracias a sus diferentes pesos moleculares; a este respecto se han caracterizado poblaciones de *T. cruzi* mostrando distintos patrones isoenzimáticos denominados zimogramas.

Miles y cols. (1977), por medio de análisis isoenzimáticos, identificaron por primera vez varios aislados brasileños agrupándolos de acuerdo a sus ciclos de transmisión en zimodemo 1 (Z_1) si provienen del ciclo silvestre, o zimodemo 2 (Z_2) si es doméstico. Estos resultados apoyaron fuertemente la necesidad de caracterizar bioquímicamente a *T. cruzi* con el fin de diferenciar cepas del parásito morfológicamente indistinguibles. Un tercer grupo fue identificado en Brasil como zimodemo 3 (Z_3) el cual fue relacionado con los ciclos silvestre y doméstico.²⁷ Los parásitos de cualquiera de estos tres zimodemos pueden infectar al hombre aunque Z_3 se ha encontrado en raras ocasiones. No se ha visto una clara relación de la patología de la enfermedad con el zimodemo del parásito, y una de las explicaciones es que se pueden encontrar en el mismo paciente mezclas de poblaciones con varios zimodemos. Posteriormente se demostraron poblaciones pertenecientes a distintos zimodemos. Actualmente se han encontrado más de 30 distintos.

A nivel de contenido total de DNA se ha visto que se presenta variabilidad del genoma entre las diferentes cepas y sus respectivas clonas.^{29,30} El contenido de DNA, determinado por diversas técnicas, tiene un rango de 125 a 280 fg por célula para varias cepas de *T. cruzi*, incluyendo el DNA del cinetoplasto (kDNA), el cual contribuye en 16 a 30 % del contenido total de DNA en la célula.³⁰ Respecto al kDNA, Morel y cols. (1980), observaron diferencias en clonas y stocks de *T. cruzi* cuando aquél se cortó con enzimas de restricción; los patrones obtenidos les permitió agrupar a las poblaciones de parásitos en esquizodemos, definiendo a éste como secuencias de DNA cortadas con enzimas de restricción separadas electroforéticamente.¹⁶ La identificación de la distribución geográfica de esquizodemos específicos podría ayudar a explicar la variabilidad clínica en individuos con enfermedad de Chagas, aunque aún no se ha confirmado la correlación entre la sintomatología y el patrón esquizodémico.³¹

La membrana del parásito es la primer área de contacto con las células del huésped, por lo que las proteínas y glicoproteínas de la membrana celular de *T. cruzi* han sido de las moléculas más estudiadas.³² Entre las numerosas glicoproteínas de superficie de *T. cruzi*, se ha descrito una de 90 kDa presente en los tres estadios del parásito,³³ ésta fue reconocida como el principal antígeno detectado por sueros de pacientes con enfermedad de Chagas en fase crónica.¹⁷ Snary y cols. (1981), describieron una glicoproteína de superficie de 72 kDa que se encuentra específicamente en los epimastigotes y tripomastigotes metacíclicos; sin embargo en pacientes chagásicos no se ha podido correlacionar los niveles de anticuerpos con las diferentes etapas clínicas o con los patrones de isoenzimas del parásito infectante.³⁴

Aunque se han descrito proteínas de la superficie celular de *T. cruzi*, resulta difícil comparar los datos publicados, no obstante estos datos indican la importancia de la caracterización antigénica de poblaciones de *T. cruzi* provenientes de diversas regiones geográficas.

HIPOTESIS

HIPÓTESIS

- Los aislados mexicanos de *Trypanosoma cruzi* están formados por clones cuyo patrón de comportamiento *in vivo* e *in vitro* difiere entre ellas y está relacionado con su virulencia.

OBJETIVOS

OBJETIVOS

- Obtener clonas de diferentes aislados mexicanos de *Trypanosoma cruzi*.
- Describir el comportamiento en ratones y en medio de cultivo de diferentes clonas de *T. cruzi* obtenidas de aislados mexicanos.
- Determinar la virulencia de las clonas en ratones.

MATERIAL Y MÉTODOS

MATERIAL Y MÉTODOS

Se trabajó con dos aislados de *T. cruzi* obtenidos del estado de Querétaro (Querétaro y Purísima) y dos de Morelos (Oaxtepec y Tequesquitengo). Se mantuvieron en ratones hasta que estos presentaran parasitemia, momento en que se realizó la clonación biológica para cada aislado.

1. CLONACIÓN DE *T. cruzi*

La clonación se realizó a partir de tripomastigotes sanguíneos presentes en ratones CD - 1 infectados con cada aislado.

1.1 Obtención y cuantificación de tripomastigotes sanguíneos.

A ratones infectados con los aislados y con parasitemia se les cortó la punta de la cola para extraer una muestra de sangre, la cual se colocó sobre un portaobjetos para tomar 10 μL y mezclar con 90 μL de solución de NH_4Cl al 0.87% en agua bidestilada, sustancia hemolisante en la que se deja reposar la sangre durante cinco minutos para favorecer su acción lítica sobre los glóbulos rojos; esto ayuda a observar y cuantificar los parásitos bajo el microscopio. Posteriormente se colocó 10 μL de esta suspensión en la cámara de Neubauer para contar el número de parásitos. Con esta técnica, se detectó hasta 1×10^6 parásitos/mL de sangre. El conteo se determinó cada tercer día hasta el momento de máxima parasitemia.

1.2 Aislamiento de tripomastigotes sanguíneos.

A los ratones de cada aislado que llegaron a presentar el máximo de parasitemia se les realizó punción cardíaca y la sangre obtenida se colocó en un tubo de fondo cónico de 15 mL que contenía heparina a una concentración de 10 U.I./mL; se diluyó con Dulbecco's modified PBS (DPBS) en proporción 1:2 y la mezcla resultante se colocó sobre una solución de Ficoll - Histopaque (densidad 1.077), teniendo cuidado de no mezclar las dos fases puesto que éste es más denso que la sangre diluida; cabe señalar que todas las manipulaciones se realizaron bajo condiciones de esterilidad; finalmente se centrifugó a 400 X g durante 45 min a 20°C.

Después de la centrifugación se formaron varias fases en el tubo, tal como se observa en la figura 6. La capa que contiene los parásitos se coloca en tubos con DPBS - albúmina sérica bovina (BSA) al 4% con la finalidad de conservar la osmolaridad del medio para que los parásitos no se destruyan.

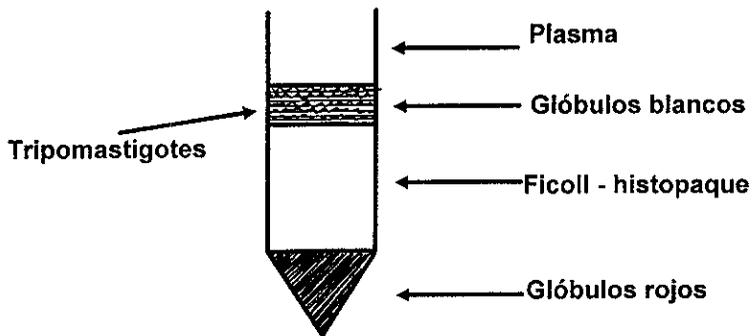


Fig. 6 Fases que se forman después de someter la sangre diluida al gradiente de Ficoll - Histopaque.

Los tripomastigotes obtenidos del gradiente de Ficoll - Histopaque, se lavaron tres veces con una solución de DPBS - BSA al 4%; para ello el paquete que resulto de la centrifugación se resuspendió en 10 mL de DPBS - BSA al 4% y entre cada lavado se centrifugo a 450 X g durante 10 min a 20°C. El paquete final se resuspendió en 1 mL de medio de cultivo LIT. Posteriormente se colocó en la cámara de Neubauer 10 μ L de la suspensión para contar el número de parásitos presentes. Se realizaron diluciones con medio LIT de manera que se tuviera 500, 1000 y 5000 parásitos/mL de medio.

1.3 Clonación.

Cajas Petri de 10 cm de diámetro, limpias, secas y estériles fueron preparadas con 10 mL de LIT - agar (Difco) al 1.5% (ver apéndice). Por otro lado, se preparó LIT - agar al 0.75% el cual, después de esterilizarse en autoclave se equilibró en baño maría a 40-41°C; los parásitos se mezclaron a razón de 1 mL de la suspensión (500, 1000 o 5000 parásitos) por 9 mL de LIT - agar al 0.75% e inmediatamente se colocaban en las cajas conteniendo previamente LIT - agar al 1.5%, de tal manera que una caja tuviera 500, otra 1000 y otra 5000 parásitos. Se incubaron a 28°C en atmósfera saturada de humedad. De las clonas obtenidas se seleccionaron 20, las más alejadas entre sí; se consideran clonas a cada una de las colonias presentes en las cajas. Para aislar las clonas se cortaron con un bisturí las zonas de agar que ocupaban cada colonia y se colocaban cada una en botellas de 25 cm² con 10 ml de LIT, las que se incubaron a 28°C.

2. REPRODUCCIÓN DE CLONAS *in vitro*.

Las clonas obtenidas y desarrolladas en botellas de 25 cm², se pasaron a matraces erlenmeyer de 125 mL con tapón de rosca conteniendo 50 mL de LIT, con la finalidad de obtener mayor cantidad de parásitos; para ello, el contenido de cada botella de 25 cm², con máximo desarrollo, se pasó a tubos de fondo cónico de 15 mL, se centrifugó a 450Xg durante 10 min. a 20°C y el paquete que se obtuvo se pasó a su respectivo matraz que contenía 50 mL de LIT y se incubaron a 28°C. Cuando en los matraces se observaba turbidez causada por el desarrollo de los tripanosomas, se cosechaba para tres finalidades: para congelar una parte de las clonas, para determinar su comportamiento *in vitro* y para hacerlo *in vivo*.

3. CONGELAMIENTO DE LAS CLONAS.

De los 50 mL de cada cultivo se tomó 10 mL de medio, se centrifugaron a 450Xg durante 10 min. a 20°C; se eliminó el sobrenadante y los paquetes obtenidos se colocaron en hielo durante tres min y posteriormente se les adicionó dos mL de medio de congelación (dimetilsulfóxido y suero fetal bovino en relación 1:9), se resuspendieron los paquetes y se repartieron en criotubos; se introdujeron en una caja de unicel para congelarlos a -50°C durante 1 día, después se transfirieron a un contenedor de nitrógeno líquido.

4. DETERMINACIÓN DEL COMPORTAMIENTO DE CLONAS *in vitro*.

De cada uno de los matraces se tomó 10 mL de medio de cultivo, se centrifugó a 450 X g por 10 min. a 20°C; se eliminó el sobrenadante y el paquete se resuspendió en 1 mL de LIT del cual se tomó una alícuota para contar los parásitos con cámara de Neubauer.

Se seleccionó al azar cinco clonas de cada uno de los aislados. Una vez realizada la cuantificación de parásitos en la cámara de Neubauer, se realizó las diluciones necesarias para cada clona, de manera que se sembraran tres botellas de 25 cm² con 1×10^6 parásitos/mL en un volumen total de 5 mL de medio LIT. Se incubaron las botellas a 28°C. Diariamente y en condiciones de esterilidad, se tomaba alícuotas de cada una de las botellas para contar los parásitos presentes. El comportamiento de las clonas se determinó en función de la curva de crecimiento que se obtuviera al registrar el número de parásitos/mL de medio durante 32 días, momento en el cual declinaba.

5. DETERMINACIÓN DEL COMPORTAMIENTO DE CLONAS *in vivo*.

5.1 Selección de la cepa de ratones.

Antes de determinar el comportamiento de las clonas en ratones se investigó la cepa de éstos últimos que permitiera observar los patrones de virulencia necesarios para evaluar su comportamiento. Se utilizaron dos cepas de ratones hembras: CD - 1 (congénica) y Balb/c (singénica), ambas de seis a ocho semanas de edad.

Con cada una de las clonas se inocularon tres ratones a dosis de 1×10^6 parásitos/200 μ l/ratón por vía intraperitoneal. Se determinó la cinética de parasitemia para cada ratón durante 45 días.

La cepa de ratón que ofreciera los resultados medibles más confiables en cuanto a grado de parasitemia y mortalidad ocasionada por las distintas cepas se seleccionaría para evaluar la virulencia de las clonas; para ella se inocularon tres ratones con cada una de las clonas obtenidas de los aislados y se determinó la cinética de parasitemia para cada ratón como se describió anteriormente.

RESULTADOS

RESULTADOS

Con la técnica de clonación realizada en la fase semisólida se obtuvieron colonias de cada aislado a las que se consideran como clonas suponiendo que cada colonia derivaba de una clona; sin embargo, no se descarta la probabilidad de que algunas colonias estén formadas por dos o más clonas puesto que *T. cruzi* es un protozoo flagelado que se puede desplazar en medio semisólido como en este caso, y que dos o más parásitos se hayan desplazado hasta agruparse formando una colonia.

Rendimiento de la clonación.

Para la clonación se sembraron 500, 1000 y 5000 parásitos/caja Petri, después de alrededor de 20 días se observaron colonias en las cajas, las cuales se separaron para cultivarlas de manera aislada. En la fig. 7 se presentan las cajas con colonias (clonas) de los aislados, sólo cinco colonias de cada aislado se evaluaron aunque más de 10 se separaron. En la figura 7.d se observa la forma como se obtuvieron al azar las cinco colonias de cada aislado, las más alejadas entre sí. Cajas como la que se observa en la fig. 7.b no se emplearon para aislar clonas ya que se desarrollaron muy juntas.

Se determinó el porcentaje de clonación para saber la eficiencia de la metodología empleada. En la tabla I se indica el número de colonias desarrolladas en las tres cajas Petri para cada aislado clonado, y su porcentaje de colonias obtenidas respecto al número de parásitos sembrados (rendimiento de la clonación). Se puede observar que para el aislado Tequesquitengo se dió el mayor rendimiento cuando se sembraron 1000 y 5000 parásitos, y un buen rendimiento al sembrarse 500 parásitos; en general, el rendimiento varió del 2% al 9%, en la literatura generalmente se obtiene del 10% al 20%, este rendimiento menor se explica por la manipulación o porque los reactivos empleados difieren; pero a pesar de esta diferencia se obtuvieron suficientes clonas para evaluar su virulencia.

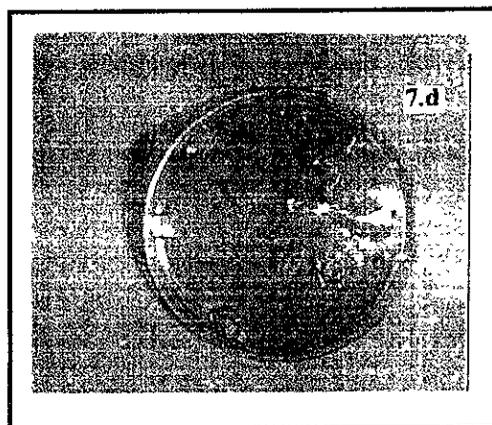
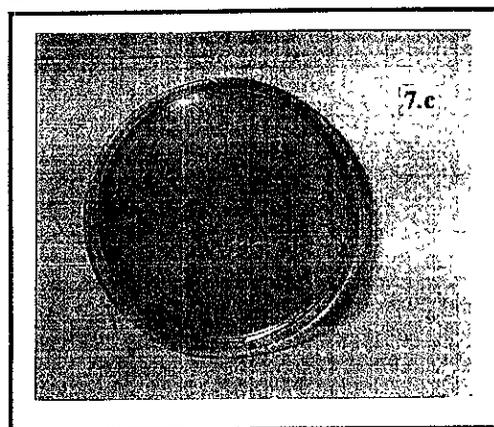
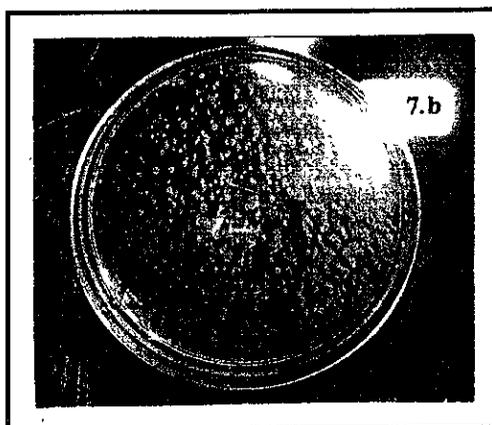
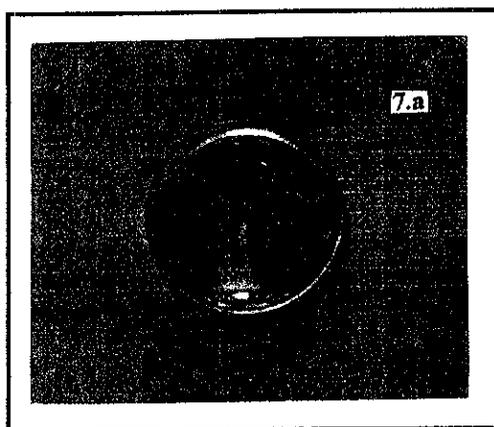
Tabla I. Rendimiento de la clonación para los diferentes aislados.

No. Parásitos Sembrados		500		1000		5000	
Cepa		1	2	1	2	1	2
Querétaro		-----	-----	4%	37	2%	73
Purísima		5%	22	7%	68	7%	320
Oaxtepec		9%	42	5%	48	-----	-----
Tequesquitengo		6%	26	16%	159	20%	997

1) Rendimiento

2) Numero de colonias desarrolladas en la caja Petri.

(---) Cajas que se eliminaron por causa de contaminación o falta de crecimiento.



Para investigar si en un mismo aislado se encuentran más de una clona fue necesario caracterizarlas biológicamente en términos de su comportamiento *in vivo* demostrado en ratones, e *in vitro* en medio de cultivo. Para los ensayos *in vivo* fue indispensable primero seleccionar la cepa de ratones en los que se determinó su comportamiento.

Selección de cepas de ratones para determinar el comportamiento *in vivo* de las clonas.

El criterio de selección de la cepa se basó en la detección de parasitemia durante un mínimo de 30 días en los ratones infectados por un aislado muy virulento y otro escasamente virulento, esto permitiría detectar clonas con virulencia intermedia. Se emplearon dos aislados, tres clonas de cada uno por la posibilidad de encontrar clonas que tuvieran mayor o menor virulencia que su mismo aislado. Comparando las curvas de parasitemia de los ratones Balb/c y CD - 1 inoculados con Querétaro (fig. 8.a y 8.b) se puede observar que, a pesar de presentarse diferencias en ambas cepas se detecta parasitemia por más de 30 días. Para el caso de los ratones inoculados con Oaxtepec (fig. 8.c y 8.d) la parasitemia sí se detecta aunque en baja cantidad. En este caso ambas cepas de ratones servirían para los ensayos ulteriores, sin embargo se decidió emplear la cepa CD - 1 por obtener las más altas parasitemias en los dos aislados además de su fácil adquisición, manipulación y porque son más resistentes a las condiciones ambientales.

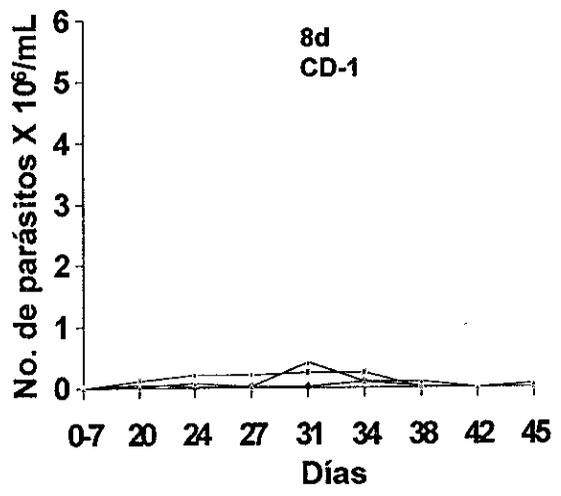
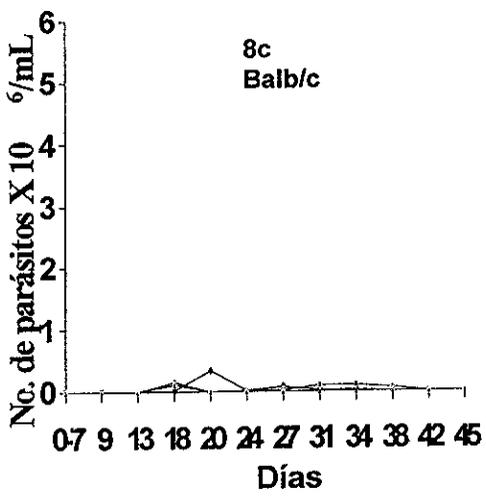
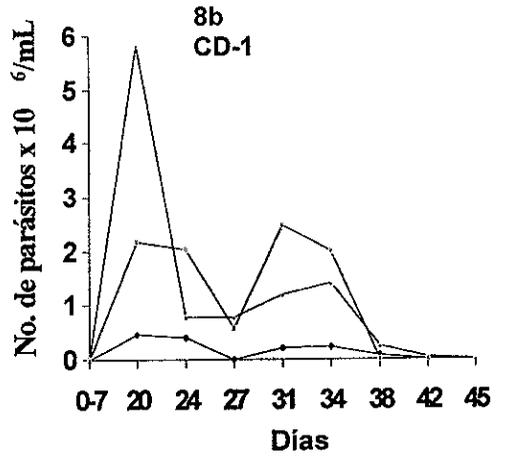
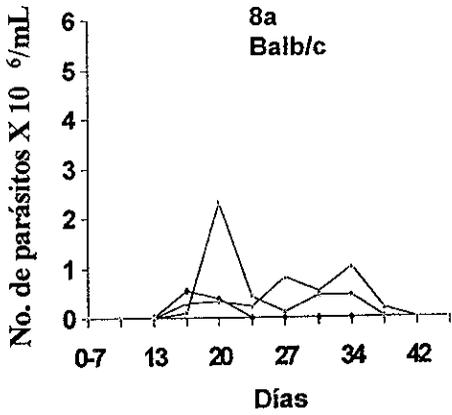


Fig. 8 Curvas de parasitemia en las dos cepas de ratones inoculados con los dos aislados y tres clonas de cada uno. Lotes de tres ratones de cada aislado con sus tres colonias fueron inoculados con 1×10^6 parásitos/ratón/200 μ L por vía i.p. y se cuantificaron los tripomastigotes sanguíneos. Cada curva representa el promedio de los tres ratones infectados para cada clona.

Fig. 8.a y 8.b: Qro.7 = \blacklozenge , Qro.8 = \blacktriangle , Qro.11 = \square .
 Fig. 8.c y 8.d: Oax.5 = \blacklozenge , Oax.6 = \square , Oax.7 = \blacktriangle

Determinación del comportamiento *in vivo* e *in vitro*.

La caracterización de las clonas en ratones se determinó en función de la parasitemia que ocasionaron y el porcentaje de sobrevivencia de los animales inoculados con cada una de ellas; *in vitro* la caracterización se determinó con base a la curva de crecimiento, la cual permite demostrar diferencias entre poblaciones del parásito.

Determinación del comportamiento *in vivo* de las clonas.

El comportamiento de las clonas se registró en términos de tiempo de inicio, magnitud, tiempo en que desaparece y tiempo de permanencia de la parasitemia. Para ello, ratones hembras de 6-8 semanas se inocularon por vía i.p. por triplicado con las clonas de cada aislado seleccionadas al azar.

Para el aislado Querétaro, las clonas seleccionadas fueron Qro.7, Qro.8, Qro.11, Qro.17 y Qro.18. En la fig. 9 se observan los resultados de los ratones inoculados con las cinco clonas y la parasitemia que presentaron; se puede ver que existen diferencias entre la clona Qro.11 y la clona Qro.17; para la primera las parasitemias promedio fueron mayores de 2×10^6 parásitos/mL de sangre durante más de 10 días (del día 20 al 34, excepto el día 27); mientras que para el caso de la clona Qro 17 fueron menores a 5×10^4 parásitos/mL de sangre durante toda la infección, esto indica que posiblemente se trata de dos clonas distintas. Para la clona Qro.11, a pesar de presentar el pico de máxima parasitemia al día 20, la magnitud fue menor que para la clona Qro.8 durante más de 10 días, acercándose al comportamiento de las otras colonias, lo que seguramente indica que las clonas Qro.7, Qro.11 y Qro.18 se tratan de la misma. Por tanto, sólo se puede decir que existen dos clonas distintas y las tres restantes son intermedias, quizá sean mezclas de aquellas que nunca se clonaron o bien clonas con comportamiento intermedio.

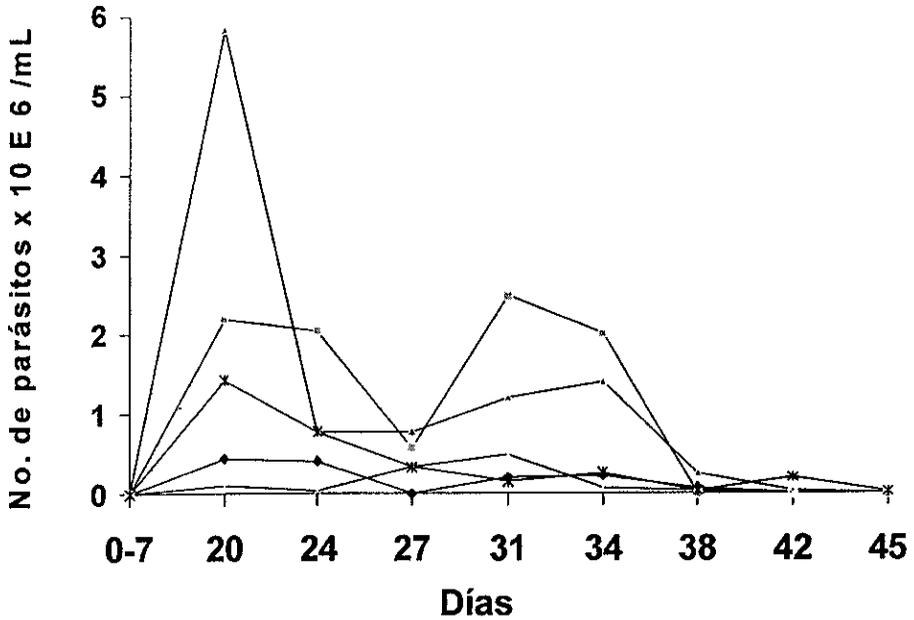


Fig. 9 Curva de parasitemia de las clonas del aislado Querétaro. Cada curva representa el promedio del lote de tres ratones con cada clona a dosis de 1×10^6 parásitos/ratón/200 μ L.

Qro.7 = ◆ , Qro.8 = ■, Qro.11= ▲, Qro.17= X, Qro.18 = *.

Para demostrar que en el aislado Purísima existen 1 o más clonas se trabajó con las colonias Pur.1, Pur.5, Pur.12, Pur.14 y Pur.20 de la misma manera que en el caso de Querétaro y se inocularon ratones CD - 1. Los resultados se presentan en la fig. 10 en la que se puede observar que la parasitemia se presentó a partir del día nueve en los ratones infectados con todas las clonas. Para los ratones inoculados con cuatro de las cinco clonas el pico de parasitemia se presentó al día 26 (clonas Pur.1, Pur.5, Pur.12 y Pur.20), en general no se observan diferencias significativas entre ellas y probablemente se trata de una sola clona.

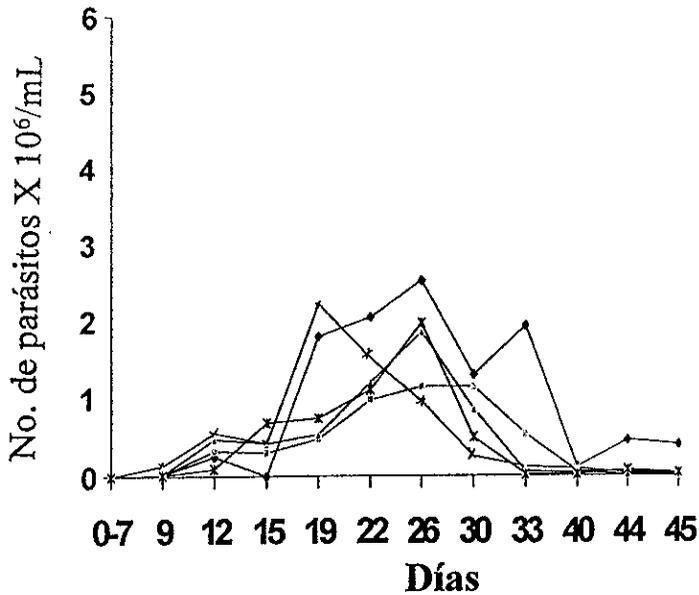


Fig. 10 Curva de parasitemia en ratones inoculados con clonas del aislado Purísima. Cada curva representa el promedio del lote de tres ratones cada uno fueron inoculados con 1×10^6 /parásitos/ratón/200 μ L.

Pur.1 = ◆, Pur.5 = ■, Pur.12 = Δ, Pur.14 = X, Pur.20 = *.

Las clonas del aislado Oaxtepec que se emplearon son: Oax.5, Oax.6, Oax.7, Oax.8 y Oax.10. En la fig. 11 se observan los resultados de la parasitemia que ocasionaron, se aprecia que todos los ratones que se infectaron con aquellas desarrollaron parasitemias relativamente bajas, aunque la clona Oax.10 presentó el pico de parasitemia al día 24, pero a partir del día 27 se comporta de manera similar a las demás por lo que no se puede asegurar que sea una clona distinta a las otras y probablemente todas pertenezcan a la misma.

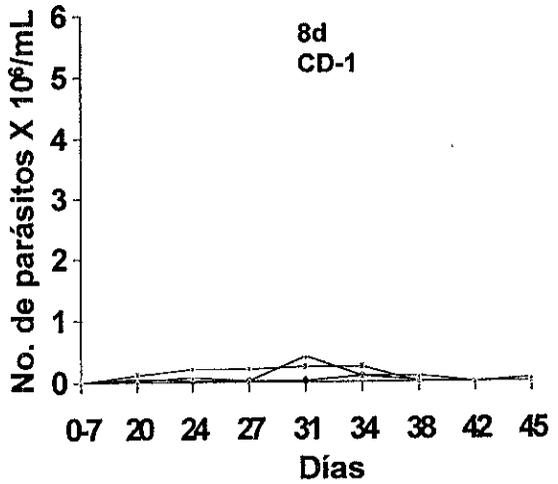
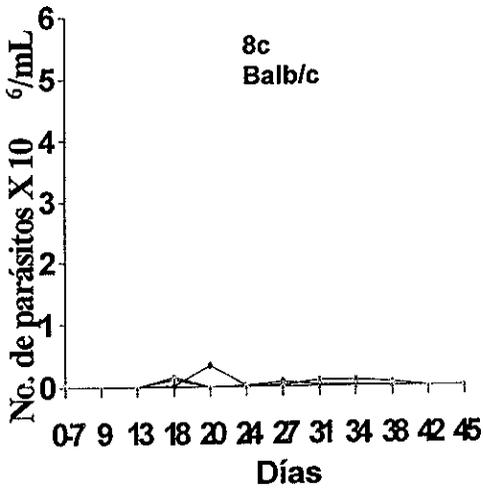
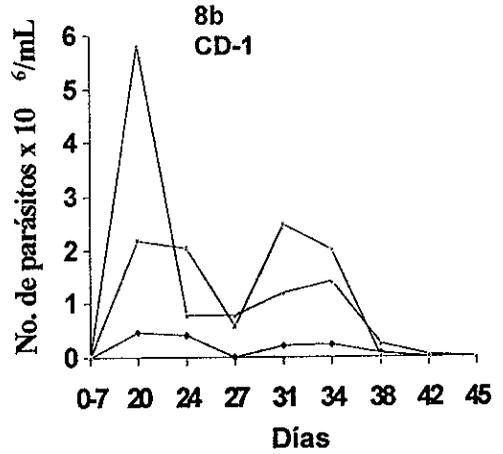
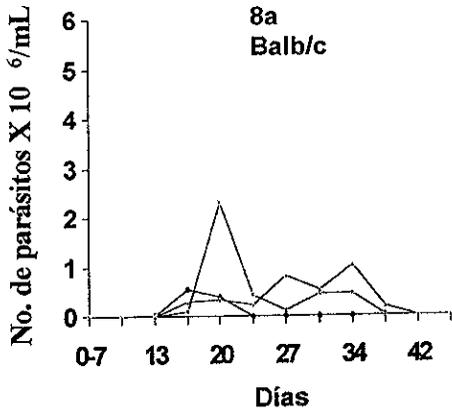


Fig. 8 Curvas de parasitemia en las dos cepas de ratones inoculados con los dos aislados y tres clonas de cada uno. Lotes de tres ratones de cada aislado con sus tres colonias fueron inoculados con 1×10^6 /parásitos/ratón/ $200 \mu\text{L}$ por vía i.p. y se cuantificaron los tripomastigotes sanguíneos. Cada curva representa el promedio de los tres ratones infectados para cada clona.

Fig. 8.a y 8.b: Qro.7 = ◆, Qro.8 = ▲, Qro.11 = □.
 Fig. 8.c y 8.d: Oax.5 = ◆, Oax.6 = □, Oax.7 = ▲

Determinación del comportamiento *in vivo* e *in vitro*.

La caracterización de las clonas en ratones se determinó en función de la parasitemia que ocasionaron y el porcentaje de sobrevivencia de los animales inoculados con cada una de ellas; *in vitro* la caracterización se determinó con base a la curva de crecimiento, la cual permite demostrar diferencias entre poblaciones del parásito.

Determinación del comportamiento *in vivo* de las clonas.

El comportamiento de las clonas se registró en términos de tiempo de inicio, magnitud, tiempo en que desaparece y tiempo de permanencia de la parasitemia. Para ello, ratones hembras de 6-8 semanas se inocularon por vía i.p. por triplicado con las clonas de cada aislado seleccionadas al azar.

Para el aislado Querétaro, las clonas seleccionadas fueron Qro.7, Qro.8, Qro.11, Qro.17 y Qro.18. En la fig. 9 se observan los resultados de los ratones inoculados con las cinco clonas y la parasitemia que presentaron; se puede ver que existen diferencias entre la clona Qro.11 y la clona Qro.17; para la primera las parasitemias promedio fueron mayores de 2×10^6 parásitos/mL de sangre durante más de 10 días (del día 20 al 34, excepto el día 27); mientras que para el caso de la clona Qro.17 fueron menores a 5×10^4 parásitos/mL de sangre durante toda la infección, esto indica que posiblemente se trata de dos clonas distintas. Para la clona Qro.11, a pesar de presentar el pico de máxima parasitemia al día 20, la magnitud fue menor que para la clona Qro.8 durante más de 10 días, acercándose al comportamiento de las otras colonias, lo que seguramente indica que las clonas Qro.7, Qro.11 y Qro.18 se tratan de la misma. Por tanto, sólo se puede decir que existen dos clonas distintas y las tres restantes son intermedias, quizá sean mezclas de aquellas que nunca se clonaron o bien clonas con comportamiento intermedio.

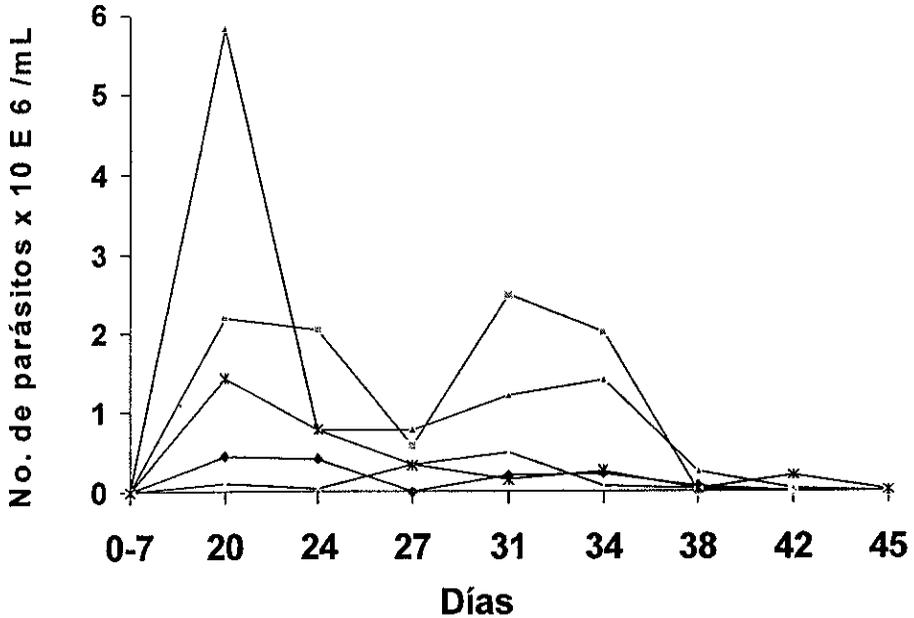


Fig. 9 Curva de parasitemia de las clonas del aislado Querétaro. Cada curva representa el promedio del lote de tres ratones con cada clona a dosis de 1×10^6 parásitos/ratón/200 μ L.

Qro.7 = ◆ , Qro.8 = ■, Qro.11= ▲, Qro.17= X, Qro.18 = *.

Para demostrar que en el aislado Purísima existen 1 o más clonas se trabajó con las colonias Pur.1, Pur.5, Pur.12, Pur.14 y Pur.20 de la misma manera que en el caso de Querétaro y se inocularon ratones CD - 1. Los resultados se presentan en la fig. 10 en la que se puede observar que la parasitemia se presentó a partir del día nueve en los ratones infectados con todas las clonas. Para los ratones inoculados con cuatro de las cinco clonas el pico de parasitemia se presentó al día 26 (clonas Pur.1, Pur.5, Pur.12 y Pur.20), en general no se observan diferencias significativas entre ellas y probablemente se trata de una sola clona.

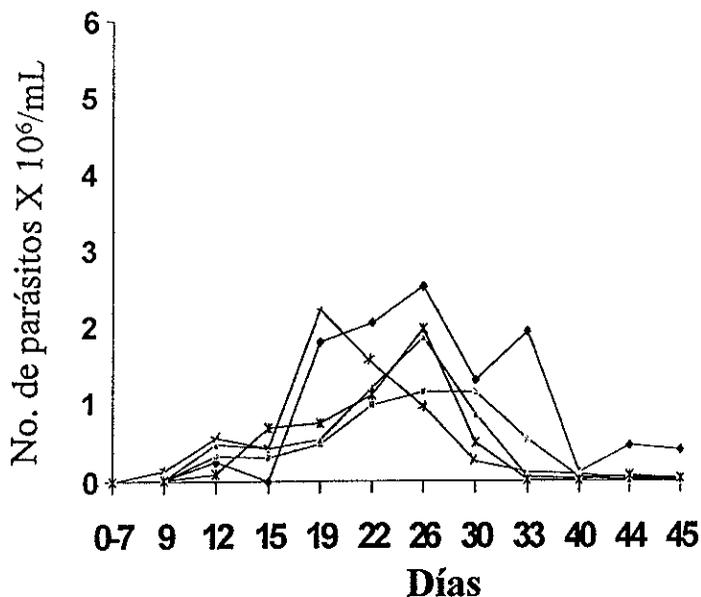


Fig. 10 Curva de parasitemia en ratones inoculados con clonas del aislado Purísima. Cada curva representa el promedio del lote de tres ratones cada uno fueron inoculados con 1×10^6 /parásitos/ratón/200 μ L.

Pur.1 = ◆, Pur.5 = ◼, Pur.12 = △, Pur.14 = X, Pur.20 = *.

Las clonas del aislado Oaxtepec que se emplearon son: Oax.5, Oax.6, Oax.7, Oax.8 y Oax.10. En la fig. 11 se observan los resultados de la parasitemia que ocasionaron, se aprecia que todos los ratones que se infectaron con aquellas desarrollaron parasitemias relativamente bajas, aunque la clona Oax.10 presentó el pico de parasitemia al día 24, pero a partir del día 27 se comporta de manera similar a las demás por lo que no se puede asegurar que sea una clona distinta a las otras y probablemente todas pertenezcan a la misma.

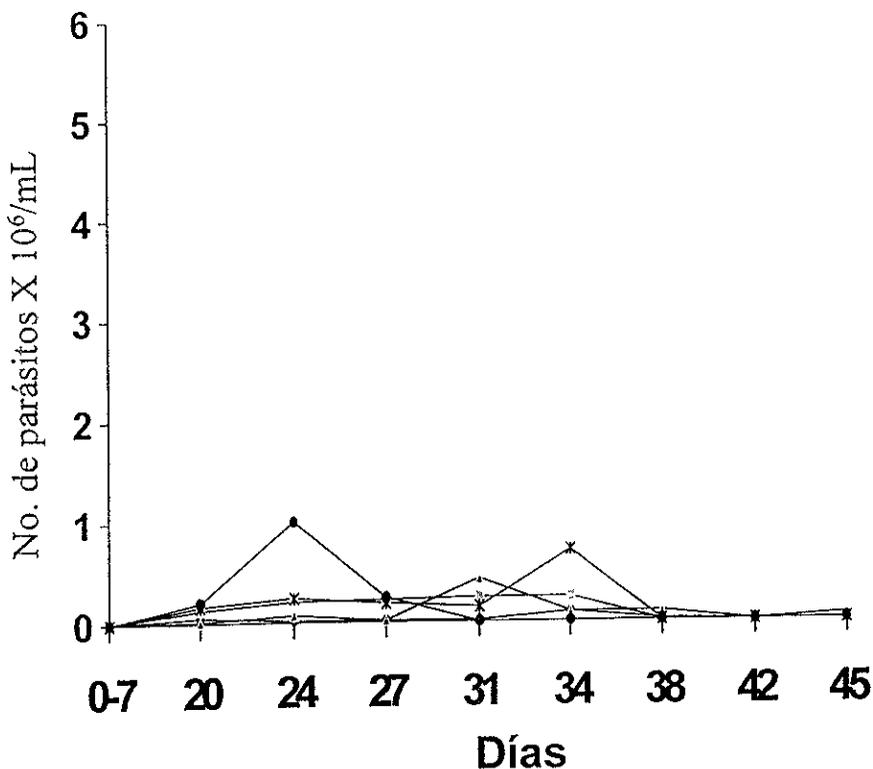


Fig. 11 Curva de parasitemia en ratones inoculados con clonas del aislado Oaxtepec.
 Oax.5 = ◆, Oax.6 = ■, Oax.7 = △, Oax.8 = *, Oax.10 = ●.

Las colonias del aislado Tequesquitengo que se utilizaron son:

Teq.2, Teq.4, Teq.6, Teq.11 y Teq.13. Los resultados de los ratones inoculados con éstas se muestran en la fig. 12 en la que se observa parasitemia detectable en los ratones a partir del día 9, siendo ésta muy baja a excepción de los ratones inoculados con la Teq.2, en los que al día 30 se observó un pico de parasitemia mayor a 3×10^6 parásitos/mL de sangre; sin embargo, con un sólo punto no es posible asegurar que ésta sea una clona diferente, pero sí que las cuatro clonas restantes pertenecen a la misma.

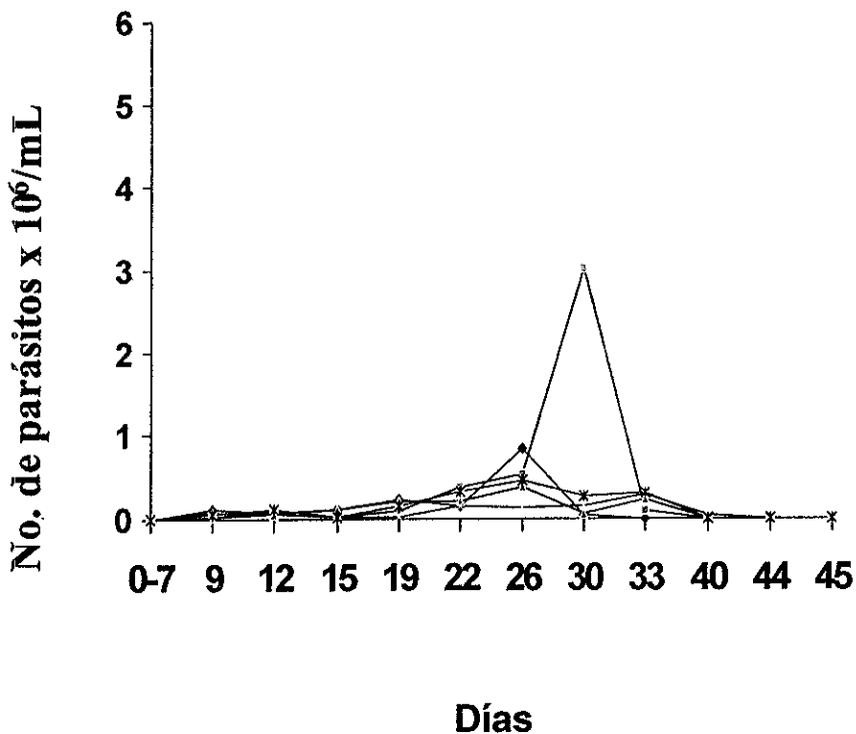


Fig. 12 Curva de parasitemia en ratones inoculados con clonas de aislado Tequesquitengo. Cada línea representa el promedio del lote de tres ratones cada uno fueron inoculados con 1×10^6 parásitos/ratón/ $200 \mu\text{L}$.

Teq.11 = +, Teq.13 = *, Teq.2 □ Teq.4 = ■, Teq.6 = x.

Porcentaje de sobrevivencia.

Uno de los parámetros más importantes para determinar la virulencia de *T. cruzi* es su capacidad para matar ratones midiéndola en términos de porcentaje de sobrevivencia. A los ratones que se inocularon por triplicado con las clonas anteriores, se registró el porcentaje de animales que sobrevivieron después de 45 días post - inoculación. Los resultados se muestran en las figuras 13, 14, 15 y 16.

Para los ratones inoculados con las colonias de Querétaro (fig. 13), se presentó la muerte en el 100% de ellos cuando se inocularon con la Qro. 8, el 33% para la Qro.7 y todos los ratones sobrevivieron con la inoculación de las restantes clonas; quizá esto indique que la Qro.8 sea una clona distinta a las demás, no así la Qro.7 ya que sólo es un ratón el que murió. Este no es el resultado esperado de acuerdo a las curvas de parasitemia registradas ya que ambas clonas tiene las curvas parecidas y en ocasiones una parasitemia alta conduce a mortalidad con mayor frecuencia que si la parasitemia es baja, en este caso sucedió lo contrario.

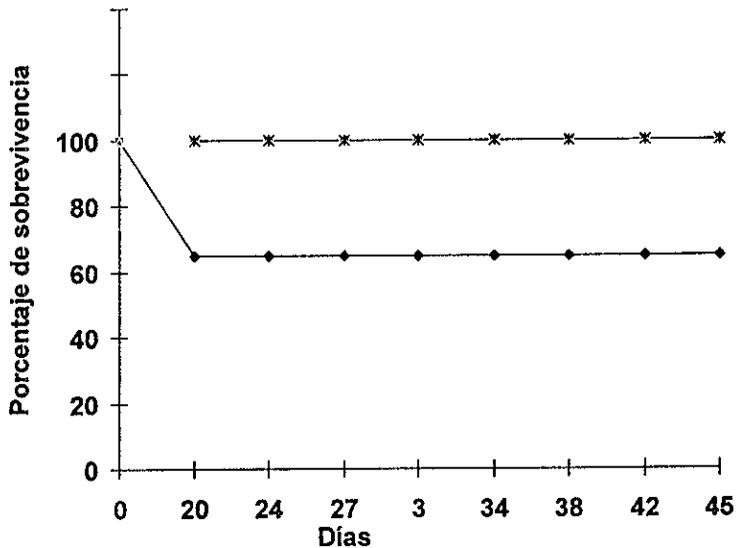


Fig. 13 Porcentaje de sobrevivencia en ratones inoculados con el aislado Querétaro.

Qro.7 = ◆ Qro.8 = *, Qro.11 = □ Qro.17 = ■, Qro.18 = X.

En las cinco clonas del aislado Purísima (fig. 14), todos los ratones infectados sobrevivieron durante los 45 días de la infección; es decir, que probablemente se tratan de una sola clona. Esto confirma el resultado de las curvas de parasitemia en donde se ve que se comportan de manera similar todas ellas.

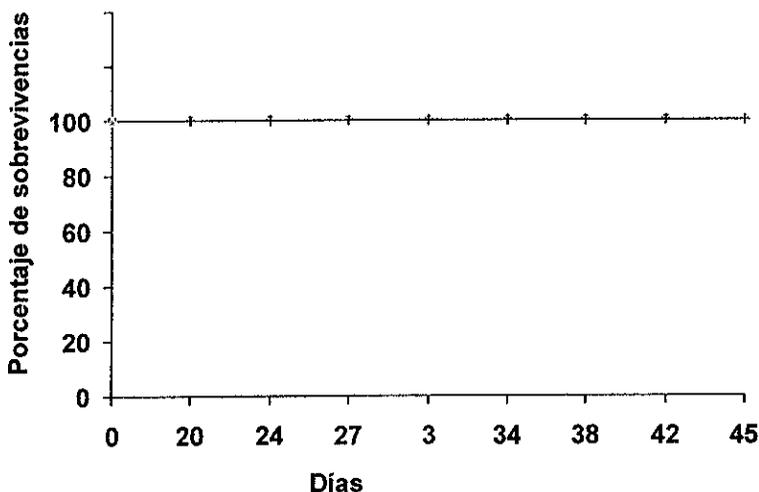


Fig. 14 Porcentaje de supervivencia en ratones inoculados con el aislado Purísima.
 Pur.5 = □, Pur.6 = +, Pur.7 = * Pur.8 = ■, Pur.10 ×.

Respecto a los resultados de supervivencia de los ratones inoculados con las colonias de Oaxtepec (fig. 15), se observa que sólo los inoculados con la Oax. 5 sobrevivieron el 100%, con Oax.8 y Oax. 0 se produjo la muerte en el 100% de los ratones, y con Oax.6 y Oax.7 la muerte se presenta en el 66% al día 45. Lo anterior señala diferencia de virulencia entre las colonias de Oaxtepec, sin embargo no es congruente con el resultado de las curvas de parasitemia en las que se observa un comportamiento similar en todas ellas; esto no permite asegurar que se trate de clonas distintas o la misma, para ello se requiere de más datos sobre su comportamiento.

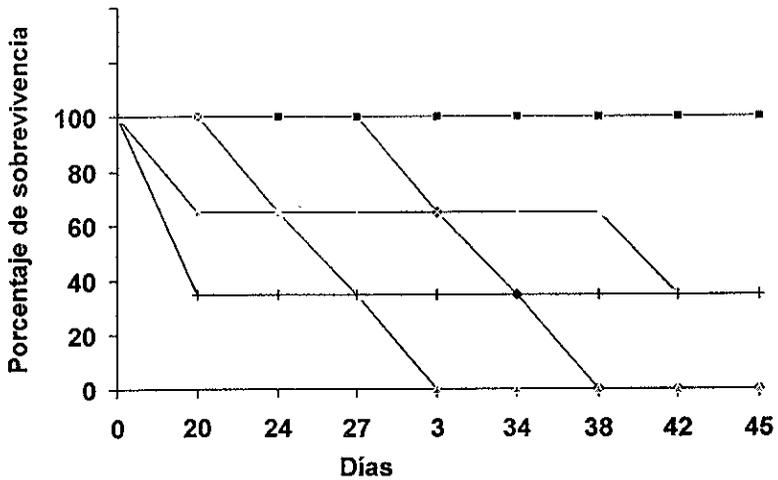


Fig. 15 Porcentaje de sobrevivencia en ratones inoculados con el aislado Oaxtepec.
 Oax.5 = □, Oax.6 = *, Oax.7 = ◆, Oax.8 = ■, Oax.10 = X.

En la curva se observa que para cuatro de las cinco clonas el pico de parasitemia más alto se presentó al día 26, las parasitemias que presentaron los ratones en general no fueron muy altas y el comportamiento es muy similar entre ellas.

El comportamiento de los ratones infectados con las distintas clonas fue muy similar y quizá se trate de una sola clona en todos los casos.

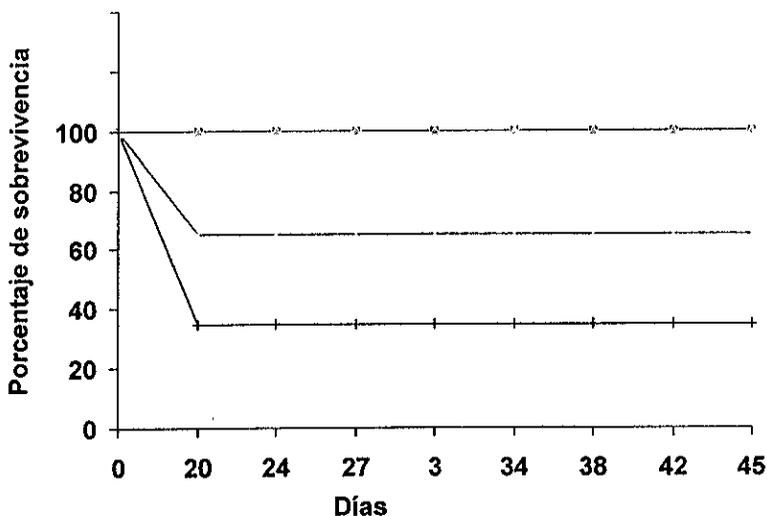


Fig. 16 Porcentaje de sobrevivencia en ratones inoculados con el aislado Tequesquitengo.

Teq.2 = □, Teq.4 = *, Teq.6 = ▲ Teq.11 = ■, Teq.13 = X.

En la fig. 16 se ve que el 100% de los ratones infectados con las clonas Teq.2, Teq.6 y Teq.11 sobrevivieron, no así en el caso de la clona Teq.4 en la que se muere el 66% de los ratones, o bien la Teq.13 que mató al 33%. Al observar las curvas de parasitemia se ve que en la Teq.4 se presentaron las parasitemias más altas respecto a las demás por lo que ambos resultados nos permiten pensar en que ésta pueda ser una clona distinta a las otras.

Determinación del comportamiento *in vitro* de las clonas.

La curva de crecimiento se determinó con base a las características de las fases de adaptación, exponencial y estacionaria que presentaron las diferentes colonias desarrolladas en medio LIT. Las colonias empleadas fueron las mismas que las empleadas en la determinación del comportamiento *in vivo*. Las figuras 17, 18, 19 y 20 muestran los resultados obtenidos.

Las curvas de crecimiento de las clonas del aislado Querétaro se muestran en la fig. 17. Las cinco colonias presentan un comportamiento similar, aunque *in vivo* hay diferencias significativas por lo menos en dos de ellas.

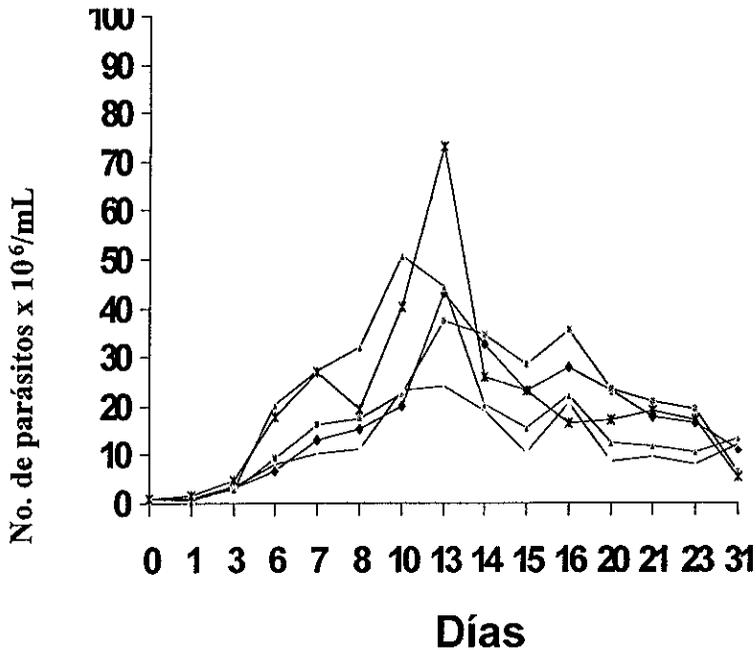


Fig. 17 Curva de crecimiento de clonas obtenidas del aislado Querétaro. Promedio de las tres botellas de 25 cm², sembradas con un inoculó de 1x10⁶/ parásitos / mL, en volumen final de 5 mL de medio LIT.

Qro. 7 = ◆ Qro. 8 = ■, Qro. 11 ▲ Qro. 17 = ×, Qro. 18 = *.

En la fig. 18. se ve que las cinco colonias de Purísima se comportan igual y que seguramente se trata de una sola clona, congruente con los resultados *in vivo* para este aislado.

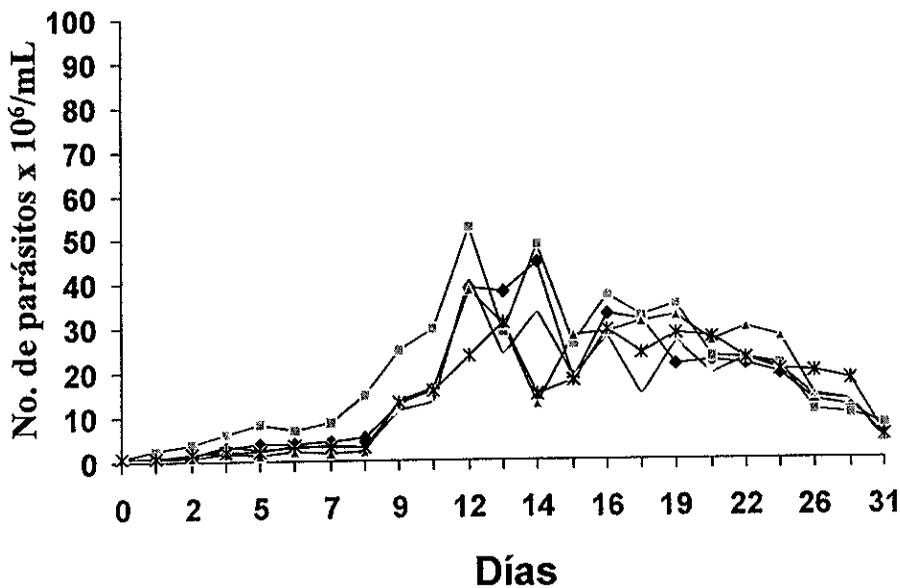


Fig. 18 Curva de crecimiento de clonas obtenidas del aislado Purísima. Promedio de las tres botellas de 25 cm² se les colocó un inoculó de 1x10⁶/ parásitos / ml, en volumen final de 5 ml de medio LIT.

Pur.1 = ◆, Pur.5 = *, Pur.12 ■ Pur.14 = ▲, Pur.20 = ×.

Las colonias provenientes del aislado Oaxtepec (fig. 19) presentan curvas de crecimiento similar a pesar de los puntos que se observan para la clona Oax.8 a los nueve días y que la curva de Oax.10 es mayor que para el resto de las colonias, sin embargo de modo no significativo.

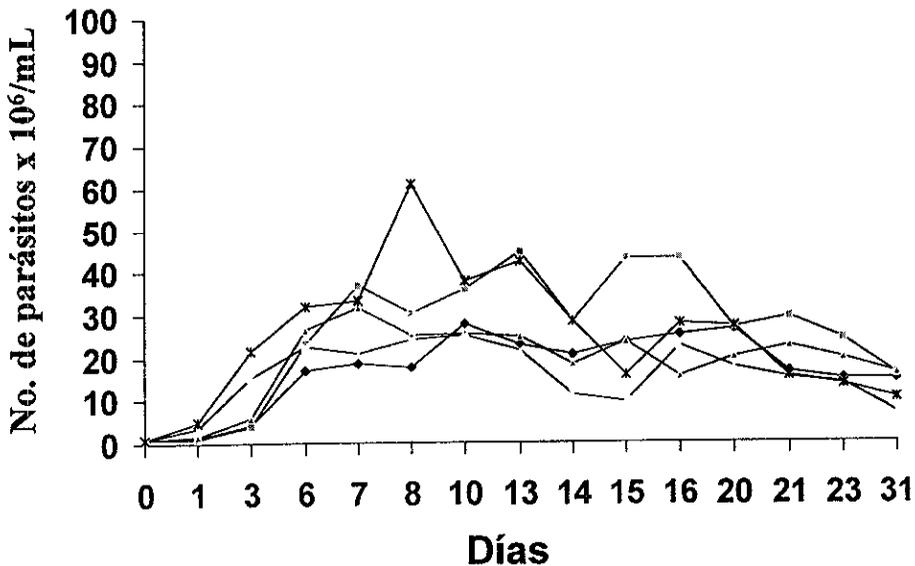


Fig. 19 Curva de crecimiento de clonas obtenidas del aislado Oaxtepec. Promedio de las tres botellas de 25 cm² se les colocó un inoculó de 1x10⁶/ parásitos / ml, en volumen final de 5 ml de medio LIT.

Oax.5 = ◆, Oax.6 = ■, Oax.7 ▲ Oax.8 = × Oax.10 = *

En la fig. 20 en la que se muestran los resultados del aislado Tequesquitengo, se observa que el comportamiento de la colonia Teq.4 es mayor que las demás, probablemente se trate de una colonia distinta a Teq.2, Teq.6 Teq.11 y Teq.13 por lo que se puede pensar que éste aislado esta compuesto por al menos dos clonas distintas. El resultado correlaciona con el de parasitemia y sobrevivencia en ratones ya que es la única colonia con comportamiento distinto a las demás.

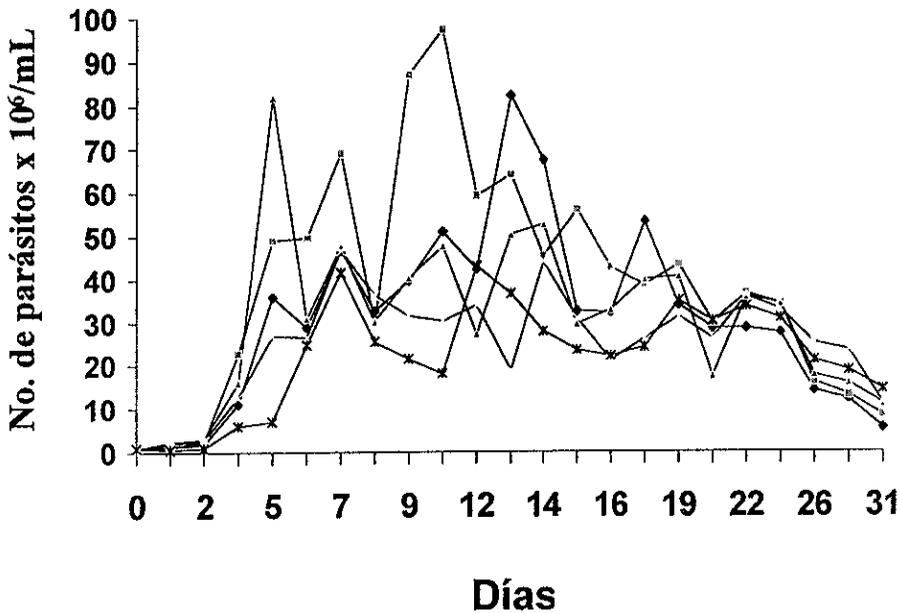


Fig. 20 Curva de crecimiento de clonas obtenidas del aislado Tequesquitengo. Promedio de las tres botellas de 25 cm², sembradas con cada clona. Teq.2 = ◆, Teq.4 = ■, Teq.6 ▲ Teq.11 = ✕ Teq.13 = *

DISCUSIÓN

DISCUSIÓN

El comportamiento de una población de *T. cruzi* es característico y depende del medio o microambiente donde se encuentre. Las cinco clonas de cada aislado permitieron demostrar que su comportamiento está en función del ambiente donde se desarrollan y que los medios empleados no permitieron para algunas clonas identificar diferencias entre ellas.

En este trabajo se demostró que las clonas obtenidas de los aislados de Morelos (Tequesquitengo y Oaxtepec), fueron más virulentas que las obtenidas a partir de los aislados de Querétaro (Querétaro y Purísima) al medio. Sin embargo la mortalidad que producen, las clonas de éstos últimos son más infectivas que las de Morelos ya que produjeron mayor parasitemia. Desde el punto de vista de parasitemia provocada en ratones, el aislado de Querétaro está formado por al menos dos clonas, lo cual se detecta por las parasitemias que producen (clonas Qro.11 y Qro.7), pero éstas presentan un comportamiento parecido a los tres restantes del mismo aislado cuando se desarrollan en medio de cultivo.

Igualmente para el aislado de Oaxtepec, por la mortalidad que ocasionan en ratones, hay al menos tres diferentes clonas: las que matan al 100% de los ratones, las que lo hacen en el 33% y las que no los matan. Sin embargo, las parasitemias que producen son relativamente bajas y sus comportamientos en medio de cultivo son similares.

Para las clonas obtenidas del aislado Tequesquitengo también se puede observar la presencia de distintas clonas debido a la mortalidad que ocasionan, pero al igual que Oaxtepec, sus curvas de parasitemia son parecidas.

Lo anterior indica que los aislados Oaxtepec y Tequesquitengo están formados por al menos dos clonas, las cuales sólo se detectan con la medición de varios parámetros *in vivo* : mediante curvas de parasitemia y mortalidad, e *in vitro* por sus curvas de crecimiento. En el caso de Querétaro sólo se detectó la presencia de una clona mediante la determinación de la parasitemia y la mortalidad, pero no por su curva de crecimiento en medio de cultivo.

En el caso de Oaxtepec notoriamente se detectan varias clonas al determinar la mortalidad que producen, no así en cultivo ni al medir sus curvas de parasitemia. Igualmente, sólo al medir la mortalidad se detectó la presencia de varias clonas para Tequesquitengo.

Para el aislado de Purísima se observó que está formado por sólo una clona, aunque no se descarta la presencia de varias clonas puesto que tal vez los tres parámetros de detección empleados no fueron suficientes; otros, como sería la descripción de su comportamiento en un número mayor de medios de cultivo o bien la infección en diferentes líneas celulares, y la medición de su histotropismo en animales de experimentación, hubieran permitido detectarlos o confirmar de manera más clara la presencia de una sola clona.

En este estudio se demuestra que la caracterización biológica *in vivo* e *in vitro* no son herramientas suficientes para identificar clonas en el mismo aislado, sin embargo es un primer paso para identificarlas. Es probable que esto mismo haya ocurrido con las subpoblaciones clonadas de Purísima: los tres sistemas de medición no fueron suficientes para demostrar la presencia de diferentes clonas. Para este caso sería recomendable el análisis molecular mediante esquizodemos, isoenzimas, cariotipos, etc. para asegurar que el aislado completo está formado realmente por una o varias clonas, o bien probar con más colonias aisladas.

El aislado de Oaxtepec frecuentemente no produce mortalidad mayor al 20% y las parasitemias no rebasan a 2×10^6 tripomastigotes/mL. Algunas de las clonas que se obtuvieron produjeron hasta el 100% de muerte, esto indica que en conjunto, como aislado, su comportamiento se ve enmascarado por el de toda la población; pero en las clonas separadas, el comportamiento es variable. Esto mismo fue observado por Lima y cols.¹⁹ con la cepa CL la cual es altamente miotrópica e infectiva, pero la clona CL-14 derivada de aquella cepa mostró nula infectividad. Esta es una de las razones por la que la gente infectada por poblaciones de la misma región presentan sintomatología tan variada, quizás las clonas más virulentas que forman parte del aislado causan la muerte de habitantes que se encuentran en zonas parasitadas por poblaciones aparentemente poco virulentas, por ejemplo, Morelos. Similarmente, lo anterior es observado con las clonas de Tequesquitengo, en la que se presenta poca infectividad pero virulencia variada. Para el caso del aislado Querétaro, se presentó mayor virulencia pero poca infectividad.

CONCLUSIONES

C O N C L U S I O N E S

1. La clonación en fase semisólida permitió obtener clonas de tres de los aislados estudiados : Querétaro, Oaxtepec, Tequesquitengo.
2. La determinación de la curva de crecimiento no permitió identificar clonas de ninguno de los cuatro aislados.
3. Los aislados de Querétaro y Tequesquitengo están compuestos por al menos dos clonas, Oaxtepec por tres, mientras que en el aislado Purísima se identificó sólo una.

APENDICE

A P É N D I C E

- Medio de cultivo LIT *

NaCl	4.0 g
KCl	0.4 g
Na ₂ HPO ₄	8.0 g
Glucosa	5.0 g
Triptosa	5.0 g
Caldo infusión de hígado	5.0 g
Hemina	25.0 mg
Suero fetal bovino (FCS) 10%	100.0 mL
Antibióticos penicilina/estreptomicina	10,000 unidades / µg / Litro
Agua bidestilada	1000.0 mL

Se prepara disolviendo en agua bidestilada los primeros seis componentes del medio, se ajusta el pH a 7.2 y se esteriliza en autoclave a 121°C por 20 minutos, ya frío se complementa adicionando en condiciones de esterilidad hemina, previamente preparada, el suero fetal bovino de manera que quede al 10% y la mezcla de antibióticos (penicilina/estreptomicina) Guardar en refrigeración.

*** Solución Stock de Hemina ***

Hemina (Sigma)	50.0 mg
NaOH (0.1N)	10.0 mL

Disolver la hemina en el hidróxido de sodio (0.1N), filtrar a través de membrana de 0.22µm en condiciones estériles, guardar en recipiente oscuro y bajo refrigeración.

• Suero Fetal Bovino (FCS) *

Descomplementar incubando 30 minutos en un baño maría a 56°C, se guarda a -20°C (Gibco BRL)

• Heparina 1000 I.U (stock 100X) *

Heparina	10,000 I.U (53.5 mg)
PBS pH 7.2 estéril	10.0 mL

Esterilizar por filtración a través de membrana de 0.22µm. Guardar a -20°C

• Ficoll - Histopaque *

1077-1 Sigma densidad 1.077 g/mL

• **DPBS ***

NaCl	8.0 g
KCl	0.2 g
Na ₂ HPO ₄ •2H ₂ O	1.15 g
KH ₂ PO ₄	0.2 g
H ₂ O bid. estéril	1000.0 mL
pH	7.2

Disolver en agua bidestilada las sales, ajustar el pH a 7.2, esterilizar en autoclave a 121°C por 20 min. Guardar en refrigeración.

• **DPBS - BSA (4%) ***

DPBS pH 7.2	100.0 mL
Albúmina Sérica Bovina (BSA)	4.0 g

Disolver la albúmina en el DPBS, esterilizar por filtración a través de membrana de 0.22µm. Guardar en refrigeración.

• **LIT Agar (1.5%) ***

Se prepara con los mismos componentes del medio LIT, pero adicionando 1.5 g de agar por cada 100.0 mL de medio.

- **LIT Agar (0.75%) ***

Se prepara el medio LIT, y se adiciona 0.75 g de agar por cada 100.0 mL de medio.

- **Solución para lisis de eritrocitos ***

NH ₄ Cl (0.87%)	0.8 g
H ₂ O bidestilada	100.0 mL

Disolver y guardar en refrigeración.

- **Solución de Congelación ***

Suero fetal bovino	9 mL
Dimetil Sulfoxido (DMSO)	1 mL

Se mezcla y se filtra a través de membrana de 0.22 μ . Se conserva a -20°C.

BIBLIOGRAFIA

BIBLIOGRAFÍA

1. WHO. Tropical diseases: progress in reseach. Programme report Geneva Switz 1990; 114:120-10.
2. Velasco CO, Guzmán BC, Cruz RJ, López O, González DF. La enfermedad de Chagas. Dirección General de Epidemiología, SSA 1991; 52-63.
3. Velasco CO, Guzmán BC. Importancia de la enfermedad de Chagas en México. Rev Lat-amer Microbiol 1986; 28:275-80.
4. Melo RC, Brener Z. Tissue tropism different *Trypanosoma cruzi* strain. J Parasitol 1986; 64:475-82.
5. Petry K, Eisen H. Chagas diseases: a model for the study of autoimmune diseases. Parasitol Today 1986; 28:275-86.
6. Budzko BD, Kierzebaum F. Isolation of *Trypanosoma cruzi* from blood. J of Parasitology 1974; 60:1037-38.
7. Wyler SD, Agabian DN, Basch FP. Cell biology of *Trypanosoma cruzi*. In: Miercio E A,eds; Medical Parasitology. New York: Alan R. Liss, 1993:64-68.
8. Katz M, Despommier D, Gwadz R. Parasitic Diseases. 2a, ed. New York:Springer - Verlag, 1988.
9. Atías A, Werner APT. Enfermedad de Chagas. Parasitología clínica. México: Interamericana, 1993.
10. Katzin AM, Lajmanovich S, González CS. Comparative stability of epimastigotes and trypomastigotes in different wash solutions. J of Parasitol 1977; 63:925-27.
11. Wittner M, Squillante L, Nadler PJ, Tanowitz BH. *Trypanosoma cruzi*: colony formation and clonal growth in agar. Exp Parasitol 1982; 53:255-61.
12. Lambrecht FL. Biological variations in trypanosomes and their relation to theepidemiology of Chaga's diseases. Rev Inst Med Sao Paulo 1965; 7:346-52.
13. Engman MD, Reddy VL, Donelson EJ, Kirchhoff VL. *Trypanosoma cruzi* exhibits inter-and intra-strain heterogeneity in molecular karyotype and chromosomal gene location. Mol and Biochemical Parasitol 1987; 22:154-59.
14. Dvorak JA. The natural heterogeneity of *Trypanosoma cruzi*: Biological and Medical implications. J Cell Biol. 1984; 24:357-71.

- 14A. Morel C, Simpson L. Characterization of pathogenic Trypanosomatidae by restriction endonuclease fingerprinting of kinetoplast DNA minicircles. *Am J Trop Med Hyg.* 1980; 5:1070-74.
15. Miles MA, Cibulskis RE. The heterogeneity of *Trypanosoma cruzi*. *Parasitol Today* 1986; 2:94-101.
- 15A. Thompson RCA, Lymberry AJ. Intra-specific variations in parasites what is a strain? *Parasitol Today* 1990; 11:345-347.
16. Morel CE, Chiari E, Plessmann C, Mattei DM, Romanha AJ, Simpson L. Strains and clones of *Trypanosoma cruzi* can be characterized by restriction endonuclease products of kinetoplast DNA minicircles. *Proc Natl Acad Sci USA* 1980; 77:6810-14.
- 16A. Tibayren M, Ayala ISJ. Towards a population genetics of microorganisms: the clonal theory of parasitic protozoa. *Parasitol Today* 1991; 9:228-32.
17. Nogueira N, Chaplan S, Tydings JD, Unkelest J, Cohn Z. *Trypanosoma cruzi* surface antigens of blood and culture forms. *J Exp Med* 1981; 53:629-39.
18. Postan M, Mc Daniel JP, Dvorak JA. Studies on *Trypanosoma cruzi* clones in inbred mice comparison of infection of C3H/HeN mice with two clones isolated from a common source. *Am J Trop Med Hyg* 1983; 32:497-506.
19. Lima MT, Jansen E, Rondinelli, Gattas CR. *Trypanosoma cruzi* : properties of clone isolated from CL strain. *Parasitol Res.* 1990; 77 : 77-81.
20. Mazzotti L, Díaz E. Dos casos humanos de enfermedad de chagas en el estado de Oaxaca. *Gac. Med.* 1940., 70 : 417-420.
21. Pérez RR. La evolución de *Schistosoma cruzi* en ratones blancos. *Ciencia* 1954., 13 :218-225.
22. Tay J, Gutierrez M, Salazar PM, Castillo Em. Estudio sobre seis cepas mexicanas de *trypanosoma cruzi*. *Rev. Inv. Salud Publica* 1973., 33 :67-76.
23. Salazar PH, Jiménez MJ, Tray J, Cárdenas RL. Estudio comparativo de la patogenicidad de cuatro cepas de *T. cruzi* en el ratón blanco. *Rev. Lat-amer Microbol* 1978; 20 :51-57.
24. Miles MA, Toye PJ, Oswald CS, Godfrey GD. The identification by isoenzyme patterns of two distinct strain-groups of *Trypanosoma cruzi*, circulating independently in a rural area of Brazil. *Trans R Soc. Med* 1977; 71:217-22.

25. Bice DE, Zeledon R. Comparison of infectivity of strains of *Trypanosoma cruzi* (chagas, 1909). *Journal of Parasitology* 1970 ; 56 :663-670.
26. Engel CJ, Dvorak JA, Segura LS, Mark ST. *Trypanosoma cruzi*: Biological characterization of 19 clones derived from two chronic chagasic patients growth kinetics in liquid medium. *J Protozool* 1982; 29:555-60.
27. Miles MA, Lanham MS, De Souza AA, Póvoa M. Further enzymic characters of *Trypanosoma cruzi* and their evaluation for strain identification. *Trans R Soc. Med* 1980; 74:221-37.
28. Dvorak JA. *Trypanosoma cruzi*: flow cytometric analysis, I. analysis of total DNA/organism by means of mithramycin-induced fluorescence. *J Protozool* 1982; 29:430-37.
29. Mc. Daniel JP, Dvorak JA. Identification Isolation and characterisation of naturally occurring *Trypanosoma cruzi* variants. *Mol Biochem Parasitol* 1993; 57:213-22.
30. Thompson CT, Dvorak JA. Quantification of total DNA per Cell in an exponentially growing population using the diphenylamine reaction and flow cytometry. *Anal Biochem* 1989; 177:353-57.
31. Sogandares FB, Matthews JL. The selection of antigens for the diagnosis, prognosis and evolutive study of Parasitic diseases. *Veterinary Parasitology* 1984; 14:185-91.
32. Bua EJ, Bontempi JE, Ruiz MA, Segura LE. Antigenos en *Trypanosoma cruzi*. *Rev Arg Microbiol* 1990; 22:47-66.
33. Snary D, Hudson L. *Trypanosoma cruzi* Cell surface proteins: identification of one mayor glycoprotein. *FEBS Lett* 1979; 21:166-70.
34. Schechter M, Stevens AF, Luquetti Ad, Snary D, Allen AK, Miles MA. Prevalence of antibodies to 72 kDa glycoprotein (Gp72) in patients with Chaga's disease and further evidence for zymodeme associated expression of Gp72 carbohydrates epitopes. *Infec Immun* 1986; 53:547-52.
35. Brener Z. General review on *T. cruzi* classification and taxonomy. *Rev Soc. Bras Med Trop supl* 1985; 18:1-8.
36. Monteón VM. Interacción de una mezcla de epimastigotes y trypomastigotes de cultivo de un aislamiento mexicano de *T. cruzi* con macrófagos. *Rev Lat-amer*

Microbiol 1992; 34:43-48.

37. Hudson L. Immunobiology of *Trypanosoma cruzi* infection and Chaga's diseases. Proc Soc. Med 1981; 75:115-23.
38. Doyle SP, Dvorak JA, Engel CJ. *Trypanosoma cruzi*: quantification and analysis of the infectivity of cloned stocks. J Protozool 1984; 31:280-83.
39. Henrikson J, Aslund L, Petersson U. Karyotype variability in *Trypanosoma cruzi* - Parasitology. Today 1996; 12:108-14.
40. Snary D, Ferguson MAJ, Scott MT, Allen AK. Cell surface antigens of *Trypanosoma cruzi*: use of monoclonal antibodies to identify and isolate an epimastigote specific glycoprotein. Mol Biochem Parasitol 1981; 3:1-14.