

61



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
ZARAGOZA

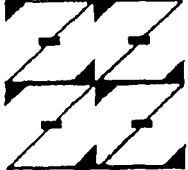
EVALUACION DE LA ESTRUCTURA  
CLONAL EN AISLADOS DE *T. cruzi* DE  
LA REPUBLICA MEXICANA CON BASE EN  
PERFILES PROTEICOS, GLICO PROTEICOS  
Y LIPO PROTEICOS

## T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:  
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO  
P R E S E N T A :  
MARTIN LEONARDO SALAZAR GRIMALDO

DIRECTOR: Biol . SERGIO PASTEN SANCHEZ

UNAM  
FES  
ZARAGOZA



LO HUMANO EJE  
DE NUESTRA REFLEXION

MEXICO, D.F.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

2002



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.

# PAGINACION DISCONTINUA

---

Este trabajo fue realizado en : El Laboratorio de la enfermedad de Chagas del departamento de Parasitología del Instituto de Diagnostico y Referencia Epidemiológicos (InDRE) de la Secretaría de Salud, bajo la asesoría de:

Biol. Sergio Pastén Sánchez  
M. en C. Carmen Guzmán Bracho

Asesorado y evaluado en la Universidad Nacional Autónoma de México  
Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, por:

Q.B.P. Gustavo Miranda Contreras  
Dr. Rubén Marroquín Segura.



---

**MI AGRADECIMIENTO Y DEDICACIÓN TOTAL PARA:**

Todas aquellas personas que con su afecto, apoyo y verdadera amistad lograron que en mí naciera una nueva imagen y deseos de exploración y superación ante el reto de la vida. Sin ustedes este trabajo no existiría. **Los quiero a todos.**

María de Jesús Grimaldo Almaguer

Maribel, Lourdes, Isabel y Adelina Santiago Grimaldo

Angel Santos López

Alma Rosa Zavala Jiménez

Yolanda Aurora Vigil Jiménez

Juan David Garcini Rodríguez

María de Jesús Chávez Valdós

Raúl Fernández García

Juan Manuel Gutiérrez Rodríguez

Luis Eduardo Villagrán Peñaflor

Sergio Pastén Sánchez

Carmen Guzmán Bracho

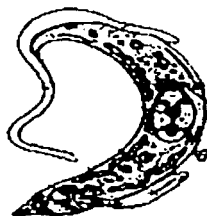
Gustavo Miranda Contreras

Rubén Marroquín Segura

Fidel García Torres†

Carlos Alberto Martínez

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**



---

Cuando vayan mal las cosas no dejes de anhelar la salvación lleno de miedo e inquietud, sino desea la paciencia necesaria para conquistar tu libertad. Aunque sientas el cansancio, aunque una ilusión se apague ¡vuelve a empezar!

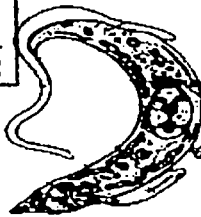
Si logras conservar intacta tu firmeza, fiel a la verdad y reacio a la mentira, verás que el odio de otros te dejará indiferente, sin creerte por ello muy sabio o muy valiente.

Mira siempre el lado luminoso de las cosas y haz que tu optimismo se realice, piensa sólo en lo mejor y espera sólo lo mejor, sonríe siempre y que tu sonrisa sea para todos, date el tiempo para amar y ser amado ya que es el privilegio de Dios, enseña a los demás a conocer y amara Dios, pero recuerda que de nada vale si tú mismo ni lo conoces, ni lo amas.

Por lo tanto, en cuanto sepas que tienes delante de tí un tiempo baldío ve en busca de amor , no pienses: *sufriré, me engañarán, dudaré.* Ve simplemente y regocijadamente en busca de amor.

*Leonardo Salazar Grimaldo*

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



---

# Tabla de contenido

Lista de Tablas.....	iii
Lista de Figuras.....	iv
Lista de Gráficas.....	vi
Lista de Anexos.....	vii
Resumen.....	viii
<b>1. Introducción.....</b>	<b>1</b>
<b>2. Marco teórico.....</b>	<b>3</b>
2.1. Antecedentes históricos.....	3
2.2. Agente etiológico.....	4
2.3. Vector.....	10
2.4. Reservorios.....	11
2.5. Epidemiología.....	11
2.6. Mecanismos de transmisión.....	13
2.7. Patología de la enfermedad de Chagas.....	13
2.8. Inmunopatología.....	14
2.9. Diagnóstico.....	18
2.10. Tratamiento.....	21
2.11. Profilaxis.....	24
<b>3. Planteamiento del problema.....</b>	<b>26</b>
<b>4. Objetivos.....</b>	<b>27</b>
<b>5. Hipótesis.....</b>	<b>28</b>
<b>6. Parte experimental.....</b>	<b>29</b>
6.1. Diseño experimental.....	29
6.1.1. Población.....	29
6.1.2. Criterios.....	30
6.1.3. Variables.....	30
6.1.4. Tipo de estudio.....	30
6.2. Materiales y equipo.....	30

---

---

6.3. Reactivos.....	31
6.4. Método.....	32
6.4.1. Obtención de extracto puro a partir de epimastigotes de <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	32
6.4.2. Determinación de la concentración de proteínas por el método de Lowry.....	33
6.4.3. Electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones reductoras (PAGE-SDS 11%, glicerol 10%).....	34
6.4.4. Tinción con azul de Coomassie.....	35
6.4.5. Tinción de carbohidratos. Oxidación p-fenilendiamina.....	36
6.4.6. Doble tinción: proteínas y sialoglicoproteínas/lípidos en geles de poliacrilamida.....	36
6.5. Análisis estadístico.....	38
7. Resultados.....	40
8. Análisis de resultados.....	67
9. Conclusión.....	73
10. Referencias.....	74
11. Anexos.....	79

---



---

**Lista de Tablas.**

Tabla	Pag.
1. Utilidad y sensibilidad de las técnicas comúnmente utilizadas para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas.....	21
2. Origen y localidad de los aislados mexicanos y cepas de referencia Sudamericanas estudiados.....	29
3. Matriz presencia-ausencia del perfil de bandeo por la tinción azul de Coomassie en 17 aislados mexicanos y dos cepas de referencia Sudamericanas. (+;presencia-ausencia).....	47
4. Matriz presencia-ausencia de bandeo en la tinción por oxidación de p-fenilendiamina en 17 aislados mexicanos y dos cepas de referencia Sudamericanas. (+;presencia-ausencia).....	56
5. Matriz presencia-ausencia de bandeo en la tinción con la reacción de Dzandu y col. en 17 aislados mexicanos y dos cepas de referencia Sudamericanas. (+;presencia,-ausencia ).....	65

---

---

**Lista de Figuras.**

Figura	Pag.
1. Estadios morfológicos de <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	5
2. Estadios morfológicos del <i>T. cruzi</i> dentro del vector.....	7
3. Ciclo biológico de <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	8
4a. Activación de mecanismos inespecíficos en contra de <i>T. cruzi</i> .....	15
4b. Mecanismos de evasión de la respuesta inmune.....	16
5. Respuesta inmune innata mediada por células NK.....	16
6. Diferenciación de los fenotipos Th1 y Th2.....	17
7. Diagrama de flujo que presenta el método utilizado.....	37
8a. PAGE-SDS.....	40
8b. PAGE-SDS.....	41
8c. PAGE-SDS.....	41
8d. PAGE-SDS.....	42
8e. PAGE-SDS.....	42
9a. Mapa de bandeo de los perfiles revelados por la tinción con azul de Coomassie de 17 aislados mexicanos y la cepa de referencia Chilena.....	43
9b. Mapa de bandeo revelado por la tinción con azul de Coomassie de 17 aislados mexicanos y la cepa de referencia brasileña.....	44
9c. Mapa de bandeo revelado por la tinción con azul de Coomassie de las cepas de referencia Sudamericanas.....	45
12. Dendrograma basado en la métrica de porcentaje de desacuerdo normalizado y el método de mínima varianza de Ward.....	48
11a. PAGE SDS.....	49
11b. PAGE SDS.....	49
11c. PAGE SDS.....	50
11d. PAGE SDS.....	50

---

---

11e. PAGE SDS.....	51
12a. Mapa de bandeo revelado por la reacción de oxidación con p-fenilendiamina en 17 aislados mexicanos y la cepa de referencia Chilena	52
12b. Mapa de bandeo revelado por la reacción de oxidación de p-fenilendiamina en 17 aislados mexicanos y la cepa de referencia brasileña.....	53
12c. Mapa de bandeo revelado por la reacción de oxidación de p-fenilendiamina para las cepas de referencia sudamericana.....	54
13. Dendrograma basado en la métrica de porcentaje de desacuerdo normalizado y el método de mínima varianza de Ward.....	57
14a. PAGE SDS.....	58
14b. PAGE SDS.....	58
14c. PAGE SDS.....	59
14d. PAGE SDS.....	59
14e. PAGE SDS.....	60
14f. PAGE SDS.....	60
15a. Mapa de bandeo revelado por la reacción de Dzandu K. y Col. para sialilipoproteínas y lípidos en 17 aislados mexicanos y la referencia Chilena.....	61
15b. Mapa de bandeo revelado por la reacción de Dzandu K. y col. para sialilipoproteínas y lípidos en 17 aislados mexicanos y la cepa de referencia brasileña.....	62
15c. Mapa de bandeo revelado por la reacción de Dzandu K. y col. para las cepas de referencia sudamericana, en la parte inferior se muestra el índice de similitud.....	63
16. Dendrograma basado en la métrica de porcentaje de desacuerdo normalizado y el método de mínima varianza de Ward.....	66

---

---

**Lista de gráficas.**

Gráfica	Pag.
1. Índices de similitud de los perfiles proteicos en 17 aislados mexicanos con respecto a las cepas sudamericanas.....	46
2. Variabilidad de los aislados mexicanos con respecto al perfil protéico más rico.....	46
3. Índices de similitud de los perfiles glicoprotéicos en 17 aislados mexicanos con respecto a cepas sudamericanas.....	55
4. Variabilidad de los aislados mexicanos con respecto al perfil glicoprotéico más rico.....	55
5. Índices de similitud de los perfiles lipoprotéicos-lípidos en 17 aislados mexicanos con respecto a las cepas sudamericanas.....	64
6. Variabilidad de los aislados mexicanos con respecto al perfil lipoprotéico más rico.....	64

---

---

**Lista de Anexos.**

Anexo	Pag.
1. Masa húmeda de parásito.....	79
2. TBS, Tris base salina 100 mM, NaCl 0.15M.....	79
3. Tioglicolato de sodio 1 :20,000.....	79
4. Inhibidores de proteasas.....	79
5. Soluciones método de Lowry.....	79
6. Electroforesis PAGE-SDS 11%, Glicerol 10%.....	80
7. Tinción azul de Coomassie.....	81
8. Tinción carbohidratos: Oxidación p-fenilendiamina.....	82

---

## Resumen

A partir del extracto crudo de cada uno de los 17 aislados de *T. cruzi* de origen mexicano y dos cepas sudamericanas de referencia se llevó a cabo la separación antigénica por medio de electroforesis (PAGE-SDS AL 11%, Glicerol 10%). Después de la electroforesis, para conocer los diversos perfiles de bandeo protéico, glicoprotéico y lipoprotéico se realizaron las técnicas de tinción con azul de Coomassie, peryodato y Plata (Técnica de Dzandu) respectivamente.

Con base en los resultados de la tinción y con un pareamiento del 1% se construyó un mapa de bandeo para cada uno de los perfiles electroforéticos y se calculó el índice de similitud de los aislados mexicanos con respecto a las cepas de referencia

En función de cada uno de los patrones de bandeo para cada una de las técnicas de tinción, se diseñó una matriz rectangular de  $n \times m$  en donde  $n$  son los patrones electroforéticos y  $m$  es el aislado. A partir de estos valores de la matriz  $n \times m$  se aplicó el algoritmo de enlace de mínima varianza de Ward el cual agrupó a los aislados y cepas de referencia de acuerdo a sus similitudes.

Los resultados obtenidos del estudio fenotípico en los perfiles electroforéticos señalan un alto grado de heterogeneidad debido probablemente a que entre los aislados se originaron distintos niveles de divergencia evolutiva.

---

---

# 1. Introducción

El parásito protozoario *Trypanosoma cruzi*, es el agente causal de la enfermedad de Chagas, una enfermedad que afecta a más de 18 millones de personas en el continente americano. En México se ven afectados 1,600,000 individuos. Debido a su diversidad genética y supuesta estructura clonal de la población del parásito, se presenta un comportamiento complejo en el huésped mamífero, lo que ocasiona que existan diferencias marcadas en las lesiones causadas que son dependientes del tropismo, virulencia y patogenicidad del aislado. En cuanto a la respuesta de anticuerpos se han observado diferentes niveles de reactividad hacia los antígenos diagnósticos disponibles. Esta problemática plantea la necesidad de encontrar antígenos que permitan clasificar correctamente a individuos infectados de diferentes áreas del país, así como evitar la presencia de reacciones falsas positivas o de reacciones cruzadas con otras patologías.

Por estudios realizados en diversos aislados de *T. cruzi* de diferentes áreas geográficas, Tibayrenc y Ayala sugieren la posibilidad de una estructura clonal basada en la existencia de una línea clonal sin interacción sexual, separada por un largo proceso evolutivo, esto sugiere una posible correlación entre la clasificación bioquímica y propiedades biológicas.

La teoría clonal de la reproducción en parásitos protozoarios es de importantes consecuencias médicas y biológicas. El análisis bioquímico de cada uno de los aislados mexicanos ofrece un extenso dato acerca del polimorfismo entre la población, indicando así dos fundamentales consecuencias de la reproducción sexual (segregación y recombinación), las cuales son aparentemente raras o ausentes en poblaciones naturales de *T. cruzi*; asimismo,

---

las clonas de estudio relacionadas pueden presentar estabilidad a lo largo de grandes áreas geográficas y por largos periodos de tiempo. Estudios realizados han propuesto que en la evolución clonal a largo plazo, ha sucedido directamente una mutación al azar en clonas separadas, probablemente debido a las características biológicas de clonas naturales de *T. cruzi*, incluyendo también las propiedades relevantes hacia medicamentos tal es la virulencia o resistencia a drogas antichagásicas.

El presente trabajo pretende investigar si los diferentes aislados estudiados de la República Mexicana presentan diversidad de expresión en los diferentes perfiles electroforéticos de proteínas, glicoproteínas y lipoproteínas y a partir de ello evaluar la posible implicación de esta diversidad en el diseño de reactivos diagnósticos.

---



## 2. Marco teórico

### 2.1. Antecedentes históricos

La tripanosomiasis americana o enfermedad de Chagas es una infección zoonótica que se transmite principalmente por insectos reduvidos al humano, animales domésticos y salvajes. Se considera un problema de salud pública y es causada por el hemoflagelado *Trypanosoma cruzi*, descubierto y aislado en 1909 por el Dr. Carlos Chagas en Brasil.

En México la primera evidencia sobre la enfermedad de Chagas data del tiempo de la colonia y se hace referencia a los vectores que fueron nombrados por fray Bernardino de Sahagún como "chínches de compostela" y las describe como "unas cucarachillas pardañas que son ponzoñosas y donde pican imprimen comezón e hinchazón".<sup>1</sup> Sin embargo, fue hasta 1920 cuando el investigador Hoffmann relacionó la enfermedad de Chagas con los triatóminos.<sup>2</sup>

Años más tarde se incrementó el estudio y conocimiento sobre la taxonomía de los vectores mexicanos y su distribución geográfica. En México, los dos primeros casos de enfermedad de Chagas fueron descubiertos en 1940 por Mazzotti procedentes del estado de Oaxaca<sup>3,4,5,6,7</sup>, quien además atribuye la virulencia a la susceptibilidad del huésped al parásito<sup>8</sup>.

En 1946, Emmanuel Días realizó la primera encuesta seroepidemiológica efectuada en el estado de Michoacán, lo que marcó la pauta para el comienzo de este tipo de actividades en nuestro país<sup>9</sup>.

---

Fue en 1957 cuando la Comisión Nacional de Erradicación del Paludismo (CNEP) inició sus actividades, y a través del estudio microscópico de muestras hemáticas obtenidas de enfermos sospechosos de padecer la malaria se detectaron aproximadamente 200 casos de pacientes con enfermedad de Chagas en fase aguda. Más tarde se inició el diagnóstico sobre casos agudos mediante serología, utilizando sueros policlonales anti IgM-humana marcados con fluoresceína, esto aumentó considerablemente el número de casos positivos<sup>10,11</sup>

A partir de 1950 se han realizado estudios que han permitido establecer que los aislamientos de *T. cruzi*, provenientes de varios transmisores, reservorios y regiones del país, difieren en su comportamiento al infectar experimentalmente animales de laboratorio. Este comportamiento tan variado se ha atribuido a múltiples causas como: factores ambientales, inmunidad, virulencia, patogenicidad, y el paso por diferentes especies de transmisores y hospederos.

## 2.2. Agente etiológico

El agente etiológico de la enfermedad de Chagas es el *Trypanosoma cruzi*, cuya descripción taxonómica se describe a continuación.

- **Taxonomía**<sup>11,12</sup>

---

**Reino:** Protista

**Orden:** Kinetoplastida

**Subreino:** Protozoa

**Suborden:** Trypanosomatina

**Phylum:** Sarcomastigophora

**Familia:** Trypanosomatidae

**Subphylum:** Mastigophora

**Género:** *Trypanosoma*

**Clase:** Zoomastigophora

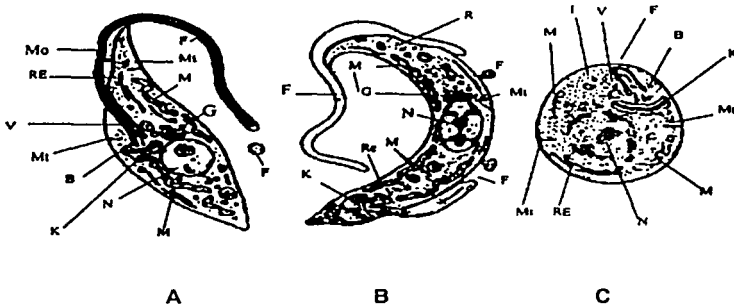
**Especie:** *cruzi*

---

• **Morfología**

*T. cruzi* presenta tres estadios morfológicos: tripomastigote (metacíclico y sanguíneo), epimastigote y amastigote. Fig. 1.<sup>13</sup>

Fig. 1. Estadios morfológicos de *Trypanosoma cruzi*



B: Blefaroblasto	Mo: Membrana ondulante
C: Citoplasma	Mi: Microtúbulos
F: Flagelo	N: Núcleo
G: Aparato de Golgi	R: Ribosomas
I: Inclusión lipídica	RE: Retículo
K: Cinetoplasto	V: Vacuola endoplásmica
M: Mitocondria	

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

El **tripomastigote metacíclico** es flagelado, alargado con un gran núcleo central, cinetoplasto de gran tamaño y el blefaroplasto posterior de donde surge un flagelo que contornea una membrana ondulante, que le confiere movimiento.

---

Este estadio presenta deficiente capacidad de reproducción y es la forma que penetra e infecta al hospedero.

El tripomastigote sanguíneo es flagelado, alargado, con el cinetoplasto grande alejado de la parte anterior del núcleo; similar al estadio anterior, puesto que también presenta flagelo y membrana ondulante. Este estadio se encuentra en la sangre y no tiene capacidad para dividirse, pero sí la tiene para invadir otras células.

El epimastigote es fusiforme, con un flagelo que forma una membrana ondulante que nace del blefaroplasto. El cinetoplasto se encuentra cercano a la parte anterior del núcleo que se localiza en posición central. Este estadio presenta división binaria longitudinal.

El amastigote es de forma redondeada llamada leishmanoide, carece de flagelo y por lo tanto de movimiento; tiene un gran núcleo cerca del cual se encuentra el cinetoplasto a manera de disco. Tiene capacidad de replicación, por división binaria simple.<sup>13,14</sup>

- **Ciclo Biológico**

El ciclo biológico de *T. cruzi* inicia cuando el insecto vector se infecta al ingerir sangre humana o de otro vertebrado que contiene tripomastigotes sanguíneos los cuales se transforman en epimastigotes y se multiplican en el intestino medio del insecto.

En el recto del insecto, después de 15 a 30 días, se transforman a tripomastigotes metacíclicos (etapa infecciosa para vertebrados) los cuales son eliminados junto con el líquido de las heces<sup>11,15</sup> cuando el insecto defeca Fig. 2.<sup>11</sup>

---

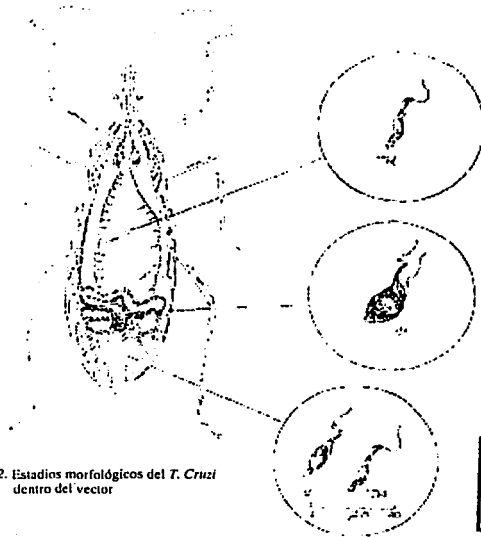


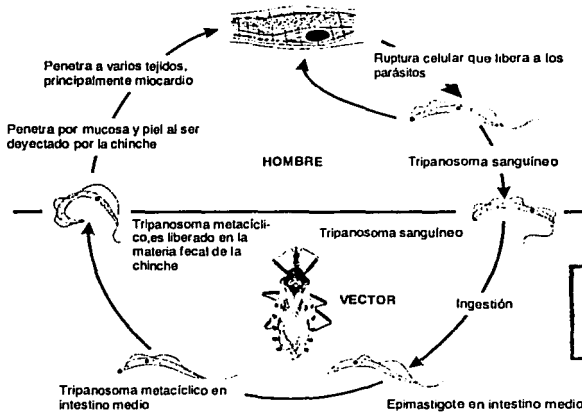
Fig 2. Estadios morfológicos del *T. Cruzi* dentro del vector

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Los tripomastigotes metacíclicos que se encuentran en las heces penetran al mamífero a través de la herida hecha por la picadura del vector o por escoriaciones que resultan del rascado, ya dentro del mamífero infectan a los macrófagos de tejido conjuntivo en la dermis o tejido subcutáneo y se transforman en amastigotes. Estas formas intracelulares sin flagelo ni membrana se multiplican por fisión binaria durante cuatro a cinco días, desintegran la célula huésped e infectan otras células formando así el foco primario. Los parásitos de este foco primario que llegan al torrente sanguíneo se transforman en tripomastigotes, los que se diseminan por el organismo invadiendo diferentes células (vísceras, músculo estriado, cardíaco, células del retículo endotelial, etc.) donde se liberan del flagelo y adquieren la forma de amastigotes y se multiplican por fisión binaria y en ocasiones forman racimos que semejan nidos, lo que lleva

a la ruptura celular. Los amastigotes son liberados en la circulación, se alargan, forman flagelos y se convierten en los primeros promastigotes, y después, al no multiplicarse reciben el nombre de tripomastigotes sanguíneos. Estos entran a otras células para repetir el ciclo.<sup>15,16</sup> Fig. 3.

Fig. 3 Ciclo biológico de *Trypanosoma cruzi*.



TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

- Estructura clonal de la población de *T. cruzi*

Los estudios sistemáticos acerca de la variabilidad dentro de la población de *Trypanosoma cruzi* se iniciaron en 1977 en Brasil. En estos trabajos se determinó la variabilidad de enzima en extractos de parásitos de diferentes regiones y hospederos mediante métodos electroforéticos.<sup>17</sup> Para 1980 el mismo grupo de investigadores reporta la existencia de tres clases de parásitos que pueden ser distinguidos con base en su patrón específico (zimograma electroforético) para un grupo de enzimas en particular, esta clase de "cepas isoζimicas" se denominaron zimodemos.<sup>18</sup> Un zimodemo agrupa a todos los

---

parásitos que muestran igualdad en el patrón electroforético, sin embargo estos zimogramas sólo se limitaron a clasificar el número y movilidad de las bandas. Tibayrenc y col. (1986) fueron los primeros en interpretar estos zimogramas en un contexto genético, demostraron la existencia de polimorfismo en aislados de diferentes hospederos y regiones de Sudamérica y concluyen que el parásito es un organismo diploide y asignan un genotipo a cada fenotipo observado.<sup>19</sup> En otros estudios con un número importante de aislados de *Trypanosoma cruzi* observaron la falta de segregación y recombinación e infieren que la reproducción del parásito es asexual y que las poblaciones de *T. cruzi* pueden tener un origen clonal "clonas naturales" definidos por los zimodemos.<sup>20,21</sup> Blanco y col (1998) reportaron zimogramas de 10 loci de aislados argentinos y diferentes hospederos, encuentran un patrón heterogéneo que sustenta la diploidia de *Trypanosoma cruzi*. Aunque sugieren que la reproducción pudo haber sido sexual en algún tiempo de su evolución, identificaron heterozigocidad fija, falta de algunos genotipos posibles en loci con múltiples alelos y desviación del equilibrio de Hardy-Weinberg, siendo evidencias de ausencia o alta restricción de reproducción sexual, lo que sustenta la propuesta de un origen multiclonal de las poblaciones de *Trypanosoma cruzi*.<sup>22</sup>

Al evaluar la variabilidad genética en secuencias hipervariables de *Trypanosoma cruzi* se definieron diferencias entre cepas y aislados del parásito. Estas secuencias hipervariables se localizan en los minicírculos de ADN del cinetoplasto (k-DNA). Los estudios por fragmento de la longitud del polimorfismo de restricción (RFLP) de minicírculos del ADN del cinetoplasto permiten evidenciar diferentes grupos, denominados esquizodemos, los cuales incluyen a parásitos con idéntico patrón RFLP. Estas evidencias confirman la existencia de polimorfismo dentro de las poblaciones de *T. cruzi*.<sup>23</sup> La formación de grupos es semejante a la obtenida con los zimogramas electroforéticos (zimodemos). La correlación entre diferentes marcadores genéticos sugiere una evolución paralela en estos marcadores y también apoya la hipótesis clonal. En 1991 Zavala y col. demostraron heterogeneidad en aislados mexicanos y una

---

---

correlación con el origen geográfico al trabajar con ADN del cinetoplasto.<sup>24</sup> En 1998 López y col. caracterizaron los perfiles isoenzimáticos, el crecimiento en medios de cultivo, la capacidad de transformación de epimastigotes a tripomastigotes, la infectividad y muerte de células en cultivo en 17 aislados mexicanos del sureste y centro de México, sus resultados mostraron variación genética entre los aislados con base en los perfiles isoenzimáticos, formación de grupos de acuerdo a su origen geográfico y no asociación entre las características genéticas y biológicas.<sup>25</sup> Recientemente Espinosa y col estudiaron la homología de la región hipervariable de los minicirculos del DNA del cineplasto de aislados mexicanos con respecto a cepas sudamericanas, sin embargo sus resultados no fueron satisfactorios para identificar subgrupos genéticos.<sup>26</sup>

### 2.3. Vector

A la fecha se han descrito 123 especies de Triatóminos en el mundo (Schofield, 1995) de las cuales 34 se distribuyen en el área Mesoamericana continental (de México a Panamá). Dentro de esta área se tienen registradas 31 especies en México, de las cuales *T. barberi*, *T. mazzottii*, *T. pallidipennis* y *T. dimidiata* merecen atención en México por presentar una amplia distribución que incluye 10, 5 y 7 entidades federativas con una densidad poblacional importante: *T. barberi*; Colima, Guerrero, Jalisco, Hidalgo, Michoacán, México, Nayarit, Morelos, Puebla y Oaxaca *T. mazzottii*; Durango, Guerrero, Michoacán, Nayarit y Oaxaca y *T. pallidipennis* y *T. dimidiata*; Colima, Guerrero, Jalisco, Michoacán, Morelos, Nayarit y Puebla. *Rhodnius prolixus* es importante desde el punto de vista epidemiológico debido a su adaptación al domicilio y eficacia como vector en la transmisión de *T. cruzi* en algunas poblaciones de los estados de Oaxaca y Chiapas.<sup>27,28</sup>

---



Las viviendas de adobe, caña y techos de hoja de palmera o de paja, ofrecen condiciones ideales para la colonización del vector; este encuentra numerosos refugios en recovecos de la construcción, como también en muebles y diversos objetos. Suele encontrarse también en zonas peridomiciliarias como gallineros o corrales. En síntesis, las deficientes condiciones de vivienda son un factor importante en el mantenimiento de la endemia chagásica.<sup>29</sup>

## 2.4. Reservorios

En México, diversos animales silvestres y domésticos han sido identificados como reservorios de *T. cruzi*. Entre los animales silvestres más comunes se encuentran la rata, el armadillo, el tlacuache, las ardillas y los ratones. Entre los animales domésticos están el gato, el perro y en algunos casos la vaca y el caballo.<sup>29,30</sup>

## 2.5. Epidemiología

La enfermedad de Chagas sólo se encuentra en América, a partir del paralelo 41 grados Norte en el sur de Estados Unidos, hasta el 45 grados Sur en Argentina, y se localiza principalmente en áreas rurales. La Organización Mundial de la Salud (OMS) estima la existencia de 11 millones de personas infectadas y alrededor de 90 millones viven en áreas endémicas con el riesgo de contraer la infección y se espera que del 15 al 20% evolucionen hacia la fase crónica de la enfermedad.

En México, en el periodo comprendido entre 1965 a 1998, se tienen registrados aproximadamente 450 casos agudos procedentes de 23 estados. Para 1990 el Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos tenía registrados 300 casos agudos comprobados, encontrando que la enfermedad está distribuida prácticamente en todo el país, pero particularmente

---

---

en los estados de Chiapas, Oaxaca, Hidalgo y Veracruz.<sup>31,32</sup> Actualmente se estima que existen aproximadamente 1,600,000, con esta cifra la enfermedad de Chagas se convierte en un problema de salud pública.<sup>33</sup>

Se considera que en México las áreas con más probabilidad endémica son las que se ubican a menos de 1800 m sobre el nivel del mar, dado que en esta región altitudinal se han encontrado altos índices de infección por los triatóminos; aunque cabe señalar que, García E.P. encontró *T. barberi* infectado en una comunidad poblana situada a 2400 m sobre el nivel del mar.<sup>34</sup>

La encuesta seroepidemiológica realizada en 1987 indicó que la enfermedad de Chagas se presenta irregularmente en el territorio Nacional. El estudio epidemiológico permitió ratificar los focos de transmisión ya conocidos e identificar algunos nuevos en los estados de Hidalgo, Chiapas y Veracruz, así como detectar trabajadores migratorios infectados en las ciudades fronterizas de Baja California, situación que indica un riesgo para la transmisión por hemotransfusión en zonas aparentemente libres de la infección. El 74.5% de los seropositivos fueron menores de 39 años. Asimismo, haber detectado infección en niños menores de cuatro años que sugiere que en algunos focos la transmisión natural aún es importante. La seroprevalencia es mayor en estratos socioeconómicos bajos, pero también se detectó en individuos pertenecientes a niveles altos, particularmente en aquellos que poseen casas de fin de semana en regiones tropicales.<sup>34, 35</sup>

La magnitud de las secuelas crónicas en el territorio nacional es discutible, debido a que los cuadros clínicos de la enfermedad no son específicos y ocasiona que se confunda con otras enfermedades.

---

---

## 2.6. Mecanismos de transmisión

La principal forma de transmisión es la vectorial, sin embargo la transfusión sanguínea constituye la segunda vía de infección en zonas endémicas. Otras vías menos comunes son: a) la transmisión co-natal de *T. cruzi*, la cual se presenta en 2 a 4 por ciento de los nacidos vivos de madres infectadas, b) la posible ingestión accidental del insecto por parte del huésped, c) la ingestión de leche materna, d) los accidentes de laboratorio al manipular sangre infectada, e) el desollamiento de animales silvestres, f) el consumo de carne semicruda de animales parasitados, g) de bebidas contaminadas con materia fecal de triatóminos y h) el trasplante de órganos infectados<sup>35</sup>.

## 2.7. Patología de la enfermedad de Chagas

La enfermedad se caracteriza por la presencia de tres fases: aguda, indeterminada y crónica.

- I. La fase **aguda** se observa después de un periodo de incubación de 4 a 10 días, y dura aproximadamente de 3 días a 4 semanas. Los síntomas incluyen fiebre, malestar, linfadenitis, hepatomegalia y esplenomegalia. Si el sitio primario de la infección es el ojo, se presenta edema unilateral de los párpados y conjuntivitis conocido como "signo de Romana". La enfermedad aguda se presenta por lo general en niños con un forúnculo o chagoma de inoculación en el sitio de infección. Pueden presentarse miocarditis y meningoencefalitis. Esta fase demora de 10 a 30 días sin mayores síntomas clínicos, antes de hacerse crónica, aunque ocasionalmente se presenta miocarditis.
  
  - II. Entre la fase aguda y la crónica se presenta la fase **indeterminada**. Un número desconocido de personas inician la infección en forma
-

asintomática y persisten así por mucho tiempo, de 10 a 30 años, o quizá después de recuperarse de un cuadro agudo de manera espontánea también permanecen asintomáticas indefinidamente. Sólo un 20-30% evolucionan hacia la fase crónica.

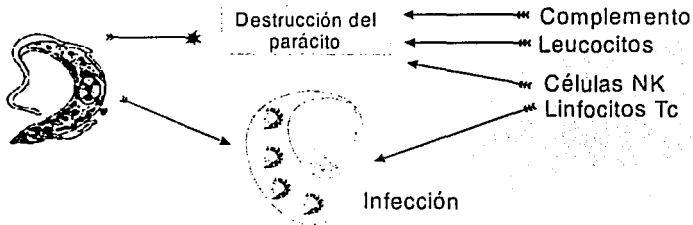
- III. La fase **crónica** es asociada con anormalidades electrocardiográficas y miocarditis, asimismo con el desarrollo de megasíndromes (megacardio, megaesófago y megacolon) si bien el parásito puede invadir cualquier célula tiene cierta predilección por el músculo cardíaco y esquelético y por el sistema nervioso central, es por ello que las manifestaciones clínicas más importantes son la miocarditis y las lesiones en el sistema nervioso autónomo del intestino. Estos síntomas varían de acuerdo a la localidad geográfica, y puede estar relacionado en parte a la heterogeneidad de *T. cruzi*.<sup>31, 37</sup>

## 2.8. Inmunopatología

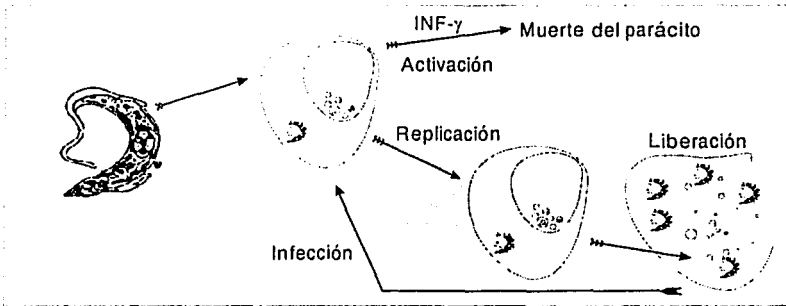
Diversos factores contribuyen a generar lesiones producidas por la infección con *Trypanosoma cruzi*, por un lado tenemos factores propios del parásito como son la interacción inicial huésped-parásito a ligandos específicos, el tropismo, la carga genética y antigénica, la magnitud del inóculo, la cepa del parásito, la mezcla de poblaciones y por otro lado los factores del huésped como es la constitución genética, la raza, el sexo, el estado nutricional, la respuesta inmune, la capacidad de los macrófagos profesionales, las células no permisibles, las células musculares, la neuroglia central y periférica, los fibroblastos, las células cebadas, etc. Como sucede en otras enfermedades parasitarias los mecanismos por los cuales *Trypanosoma cruzi* produce lesiones son multifactoriales, sin embargo la infección de diversos órganos y tejidos puede ser aleatoria.

---

Al penetrar el parásito al organismo puede ser destruido por mecanismos inespecíficos como son el complemento, leucocitos con receptor Fc, células NK y linfocitos T citotóxicos (Fig 4a), o evadir los mecanismos microbicidas de las vacuolas. Ya en el citoplasma cambia su morfología y antígenos de superficie. El parásito incorpora glicoproteínas del lisosoma y evade el ataque. Por acción de la hemolisina que actúa a pH ácido, la célula se rompe y los parásitos como los organelos de la célula son liberados al intersticio en donde exponen un mosaico antigénico que induce una rápida reacción inmune específica mediada por células, se representa una reacción inflamatoria aguda y focal con exudado de células mononucleadas alrededor de las áreas de necrosis. Los mecanismos de evasión a la respuesta inmune son complejos y poco entendidos, se habla de moléculas necesarias para la internalización, de mecanismos de escape a la lisis mediada por complemento, de la endocitosis de anticuerpos por el parásito, del polimorfismo genético, de la expresión conjunta de antígenos inmunodominantes, del mimetismo antigénico, de la supresión de la liberación de  $IFN\gamma$  por linfocitos Th1, de la activación policlonal de células T y B y de la excesiva producción de  $TNF\alpha$  (Fig 4b).

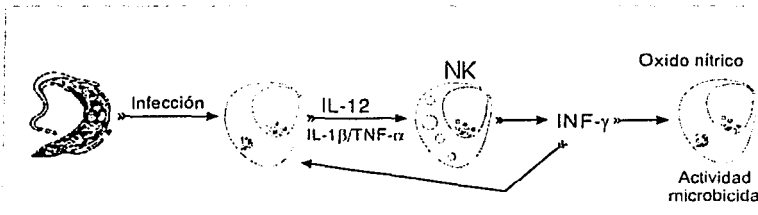


**Fig 4 a.** Activación de mecanismos inespecíficos en contra de *T. cruzi*.



**Fig 4b.** Mecanismos de evasión de la respuesta inmune.

En la fase de invasión hay activación policlonal temprana, se incrementan los niveles de IL-12 y se induce la producción de IFN $\gamma$ . Las citocinas IL-1 $\beta$  y TNF $\alpha$  potencian los efectos de IL-12 en células NK y el IFN $\gamma$  por un lado incrementa la síntesis de IL-12 de macrófagos expuestos a productos del parásito y por otro activa la sintetasa del óxido nítrico de macrófagos inducibles promoviendo la actividad microbicida que controla el número de parásitos (Fig 5).



**Fig 5.** Respuesta inmune innata mediada por células NK.

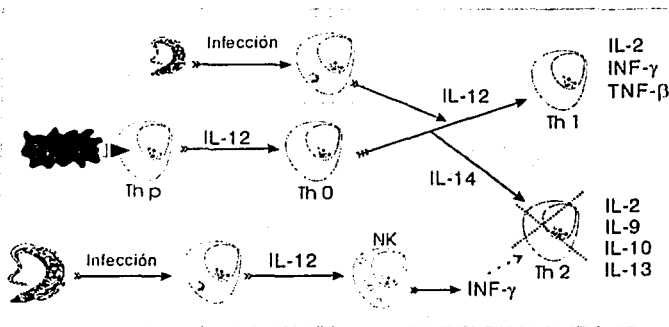
**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

En general, la respuesta inmune adquirida a infecciones puede ser de tipo Th1 o Th2 de acuerdo al perfil de citocinas producido. En la fase aguda de la infección chagásica se desarrolla una respuesta defensiva que involucra la

activación de células fagocíticas, la producción de  $\text{INF}\gamma$  y la generación de anticuerpos específicos que colaboran con los linfocitos T  $\text{CD4}^+$ ,  $\text{CD8}^+$  y células NK, en conjunto ejercen un efecto protector a la infección debido a su capacidad citotóxica y/o a su capacidad productora de  $\text{INF}\gamma$ .

La estimulación de las células T precursoras ( $\text{Th}_p$ ) por células profesionales presentadoras de antígenos (macrófagos, células dendríticas), induce la síntesis de IL-2 que promueve la proliferación y diferenciación hacia sus estados efectores  $\text{Th1}$  o  $\text{Th2}$ , vía  $\text{Th}_0$ . Los niveles altos de IL-12 favorecen la diferenciación hacia el fenotipo  $\text{Th1}$  y el desarrollo de inmunidad mediada por células. Por el contrario, elevados niveles de IL-4 favorecen la diferenciación hacia el fenotipo  $\text{Th2}$ . El  $\text{INF}\gamma$  es un potente inhibidor de la diferenciación hacia el fenotipo  $\text{Th2}$ , favoreciendo así el fenotipo  $\text{Th1}$ . La respuesta  $\text{Th1}$  se caracteriza por el perfil de citocinas:  $\text{INF}\gamma$ , IL-2 y  $\text{TNF}\beta$ , mientras que la respuesta  $\text{Th2}$  presenta el perfil; IL-6, IL-9, IL-10 e IL-13. Las células  $\text{Th1}$  están íntimamente relacionadas con la respuesta inmune efectora de agresión tisular, mientras que las  $\text{Th2}$  se asocian con una fuerte respuesta de anticuerpos y respuestas alérgicas (Fig 6).

**Fig 6.** Diferenciación de los fenotipos  $\text{Th1}$  y  $\text{Th2}$ .



**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

A pesar que *Trypanosoma cruzi* puede infectar cualquier tipo celular, hay cepas que presentan tropismo por ciertas células, tejidos y órganos. En resumen las diferentes entidades anatómico-clínicas de la enfermedad, como son la cardíaca o digestiva que evoluciona a miocarditis fibrosa crónica con falla del corazón o megas, van a ser determinadas por el tropismo a diferentes órganos, la intensidad del parasitismo, la intensidad de la respuesta inflamatoria y el tipo y evolución de la respuesta inmune. Poco es conocido acerca de los mecanismos inmunológicos íntimos que controlan los cambios locales y generales del organismo durante la evolución de la infección chagásica, por lo tanto el conocimiento de la historia natural de la enfermedad es fragmentario.

En la fase crónica asintomática hay presencia de inflamación aguda y focal, el parasitismo es probablemente controlado por diversos mecanismos como son; la fijación del complemento, los anticuerpos y los linfocitos citotóxicos (CD8+) activados por linfocitos CD4+,<sup>38,39</sup> pero en el 20 o 30% de los pacientes que evolucionan a fase crónica sintomática se ha sugerido la posibilidad que los mecanismos autoinmunes juegan un papel importante en el progreso de la enfermedad. Hay evidencias sobre mecanismos autoinmunes que están relacionados con la génesis de la miocarditis chagásica crónica, se habla de la relación parásito-autoantígenos en la enfermedad chagásica, de la desviación de la respuesta inmune por alteraciones de la matriz extracelular con una importante participación de macrófagos, linfocitos, fibroblastos y citocinas.

## **2.9. Diagnóstico**

El diagnóstico parasitológico de la fase aguda se realiza normalmente por métodos directos que permiten demostrar la presencia del parásito en la sangre (frote directo, gota gruesa, xenodiagnóstico y/o hemocultivo). La baja parasitemia característica de la fase crónica de la enfermedad, genera la necesidad de un diagnóstico indirecto (serológico) altamente sensible y

---



---

específico que ponga en evidencia la presencia de anticuerpos específicos presentes en el suero del paciente, esto es posible haciendo uso de técnicas como: inmunofluorescencia indirecta (IFI), hemaglutinación indirecta (HAI) y ensayo inmunoenzimático (ELISA).<sup>40</sup>

El xenodiagnóstico (XD) es una técnica de amplificación para la detección de *T. cruzi* en humanos y otros mamíferos. Para el XD, son utilizados triatóminos no infectados y en ayuno que se colocan en la superficie del brazo del individuo a ser examinado durante 20 a 30 minutos. Después de aproximadamente 30 días, las heces del insecto son examinadas microscópicamente para observar el movimiento de tripomastigotes. No obstante, se reporta que en la mayor parte de los casos de enfermedad de Chagas, particularmente en infecciones crónicas, los resultados obtenidos no han sido satisfactorios. Por lo tanto, el diagnóstico parasitológico se puede establecer en todos los casos agudos hasta seis semanas después de la infección, pero sólo es posible en 40% de los casos crónicos.<sup>41</sup>

En cuanto a las pruebas serológicas, estas por sí solas brindan un diagnóstico presuntivo, pero en conjunto con evidencias clínicas y epidemiológicas son de importancia para establecer el diagnóstico de la enfermedad. Los equipos de diagnóstico comercial están fabricados con antígenos crudos, semi-purificados o recombinantes de *T. cruzi*. Existe una considerable variación en su robustez y precisión, puede haber reacción cruzada con otros patógenos. Los extractos crudos de antígeno protéico de epimastigotes tiene una especificidad limitada y no posee una alta reactividad de IgG/IgM a epítopes de estos antígenos en pacientes con fase aguda o congénita de la enfermedad de Chagas. La fracción de antígeno de epimastigote, debido a su complejidad, favorece la aparición de reacciones falsas positivas y reacciones cruzadas con sueros de pacientes con otras infecciones. Esta heterogeneidad antigénica no permite la diferenciación diagnóstica entre las fases aguda y crónica, ni tampoco entre las manifestaciones clínicas de la enfermedad.<sup>42</sup>

---

---

Se desarrolló una técnica de ELISA para la detección de anticuerpos anti-*T.cruzi* con 2 péptidos, TcD y PEP2, se usaron de forma individual y en combinación. Se evaluó con un panel de 260 sueros, 179 de pacientes chagásicos y 37 sueros de pacientes con otras patologías como lepra, tuberculosis y leishmaniasis. Los resultados obtenidos con cada péptido presentaron sensibilidad de 93.8 % y 91.6 % (TcD y PEP2 respectivamente), mientras la combinación de péptidos mostró una sensibilidad de 99.4%. Las respectivas especificidades reportadas fueron de hasta 93%, 91% y 98.7% .<sup>43</sup>

En otra investigación se desarrolló la técnica de inmunoelectrotransferencia (Western blot) con la fracción antigénica citosólica de epimastigote. El estudio fue evaluado con un pequeño panel de sueros derivados del estudio antes descrito. La reacción es considerada positiva cuando al menos 3 de 7 bandas de los siguientes pesos moleculares son identificadas; 14, 19, 27, 30, 34 y 75 kDa. El resultado es indefinido con la aparición de 2 bandas y negativo con una sola banda. Usando este algoritmo, el experimento muestra una sensibilidad de 99.3% y una especificidad de 100%. Estos estudios señalan la necesidad de evaluar la especificidad y exactitud para confirmar la enfermedad en otros escenarios epidemiológicos, de gran utilidad pueden ser la aplicación de antígenos obtenidos por clonación o síntesis.<sup>42</sup>

La tecnología reciente para el diagnóstico serológico de la enfermedad de Chagas consiste en el uso de antígenos recombinantes y/o péptidos sintéticos que mejoren la reproducibilidad, la facilidad de ejecución, el uso de pequeños volúmenes de muestra, su costo y que ofrezcan máxima confiabilidad de acuerdo a su sensibilidad, especificidad y valores de predicción. Estas técnicas de diagnóstico son susceptibles a ser producidos a gran escala y con aceptable grado de pureza.<sup>42</sup> Sin embargo estos atributos podrían ser limitados al aplicar estos reactivos a diferentes zonas geográficas.<sup>43</sup>

---

Recientemente, técnicas de biología molecular como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) han mostrado un aparente elevado grado de eficiencia, con un rango inicial de sensibilidad del 96 hasta 100% comparado con las técnicas serológicas y parasitológicas. Este nivel de sensibilidad se ha logrado al amplificar una secuencia repetitiva del ADN del cinetoplasto de *T. cruzi* (KADN), por lo que parece ser una buena alternativa para la detección de *T. cruzi* en sangre humana. Sin embargo, inconsistencias de su utilidad en la clínica han sido observadas por otros investigadores.<sup>44</sup>

Las técnicas que generalmente son utilizadas en la clínica para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas se presentan en la Tabla 1.

*Tabla 1.* Utilidad y sensibilidad de las técnicas comúnmente utilizadas para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas

TÉCNICA DIAGNÓSTICA	UTILIDAD	SENSIBILIDAD
Frotis Directo	Fase aguda	Depende del observador
Gota Gruesa	Fase aguda	Depende del observador
Xenodiagnóstico	Fase aguda Fase crónica	100% 40%
Hemocultivo	Fase aguda y congénita	90%
HAI	Fase indeterminada Fase crónica	98%
IFI	Fase indeterminada Fase crónica	98-99% (depende del observador)
ELISA	Fase indeterminada Fase crónica	98-99.5%

## 2.10. Tratamiento

El tratamiento médico tiene como finalidad eliminar el agente causal, las manifestaciones clínicas, las complicaciones o la muerte. Para que esto suceda el tratamiento debe ser; oportuno, adecuado, ininterrumpido y suficiente, por lo que habrá de realizar un diagnóstico veraz y temprano.

No existe un tratamiento definitivo, inmunológico o medicamentoso. El tratamiento específico se debe establecer con rapidez en la fase aguda, cuando se logra mejorar la sintomatología y los parásitos desaparecen de la sangre periférica en cinco días. En los casos crónicos se logra la disminución de la parasitemia y se revierte el xenodiagnóstico positivo, pero no sucede lo mismo con la reacción serológica que pocas veces se vuelve negativa. Son dos los medicamentos que se usan; nifurtimox y benznidazol, este último es el de mayor elección. El tratamiento no mejora la función cardiaca, las manifestaciones clínicas, ni la progresión de la enfermedad.<sup>45</sup>

El tratamiento médico para la enfermedad de Chagas es un tratamiento antiparasitario efectivo sólo mientras el parásito se encuentra circulante, una vez que ha causado lesiones en órganos blanco ya no es útil por lo que el médico se limitará a la atención de las complicaciones. Como indicación principal, el medicamento debe ser administrado en fase aguda ya que previene daños posteriores; no obstante, durante la fase indeterminada tiene capacidad de limitar los daños en pacientes menores de 18 años.<sup>45</sup>

*Esquema de tratamiento en fase aguda e indeterminada.*

En la fase aguda es muy útil el nifurtimox. En adultos se administra a dosis de 7 a 10 mg /kg de peso por día (máximo 700mg al día). En los menores de 15 años, que toleran más el medicamento, la dosis es de 15mg/Kg de peso, repartidos en tres tomas diarias durante 60 días consecutivos. En los casos indeterminados menores de 18 años es útil el nifurtimox a las dosis citadas para prevenir posibles complicaciones que se presentan en la fase crónica.

Un tratamiento alternativo en casos graves también ha mostrado ser eficaz el benznidazol, un derivado del 2- nitroimidazol, a dosis de 5mg/kg de peso en todas las edades repartidas en dos tomas diarias durante 30 días

---

ininterrumpidos. Se recomienda vigilancia médica estrecha, en pacientes con antecedentes de daño hepático, renal, pulmonar y hematopatías.

#### *Tratamiento en fase crónica*

El esquema de tratamiento en fase crónica es sintomático y se dirige a limitar los daños causados por el parásito.

Chagas congénito. La vigilancia de mujeres embarazadas con esta enfermedad debe ser estricto ya que un número importante de productos fallecen antes de nacer y , aquellos que sobreviven tienen una expectativa de vida menor a un año. Se administra al recién nacido el nifurtimox, a dosis diarias de 8 a 25mg/kg de peso, por 30 días consecutivos esto disminuye el riesgo de morir.

Precauciones especiales. El medicamento está contraindicado en pacientes con daño cerebral, estados convulsivos, psicosis, así como en mujeres en periodo de lactancia. No administrarlo en mujeres embarazadas.

Evaluación de la efectividad del tratamiento. La evaluación en casos agudos se debe centrar en estudios serológicos. La enfermedad de Chagas es de evolución crónica y requiere una vigilancia sostenida durante años, sobre todo en los casos no tratados, tratados tardíamente o en forma incompleta. La vigilancia comprende: control del paciente en tratamiento, exámenes clínicos periódicos, parasitoscopías de sangre para verificar la erradicación de los tripanosomas circulantes, serología para conocer los niveles de anticuerpos y vigilancia del funcionamiento del corazón. El enfermo puede considerarse como curado si dos exámenes diagnósticos consecutivos con 30 días de intervalo resultan negativos; con frecuencia, los cuadros agudos tratados a tiempo remiten pronto hacia la curación. Si no se logra la mejoría en un mes después de

---

---

administrado el medicamento, se realizarán los estudios clínicos y de laboratorio y según los resultados se procederá como sigue:

- a) Con parasitoscopia positiva. Se considera caso activo y se administra nuevamente el tratamiento médico por 30 días.
- b) Con parasitoscopia y serologías negativas. Si ha pasado un mes de concluido el último tratamiento, se considera como curado el paciente.
- c) Con serologías positivas. El caso se catalogará como activo, no sujeto a terapia con fármacos específicos, pero que requiere vigilancia médica anual, que incluya un electrocardiograma y pruebas serológicas.

Casos tratados, no curados, en fase indeterminada. Si durante su seguimiento se presentan manifestaciones clínicas de etapa crónica de la enfermedad, se canalizan a un centro hospitalario con servicios especializados, para su estudio y manejo.<sup>45</sup>

## **2.11. Profilaxis**

Las estrategias planteadas por las autoridades de salud:

- Interrumpir la transmisión de la enfermedad de Chagas en lugares endémicos donde el carácter intradomiciliario del padecimiento hace a los vectores triatóminos susceptibles de ser eliminados. Para el control de vectores existen diversos métodos, tales como los biológicos, genéticos, culturales, físicos químicos y el control integrado; por su factibilidad y viabilidad. La Norma Oficial Mexicana 032 describe los medios físicos, a través de mejoramiento del ambiente y saneamiento básico; los químicos, con el empleo de insecticidas y algunos utilizados para el control biológico.<sup>45</sup>
-

- El control de calidad y la adecuada preservación de órganos, tejidos y sangre son factores determinantes para la eliminación de la enfermedad de Chagas inducida por implantes o por transfusión de sangre.
  - El diagnóstico oportuno y la quimioterapia efectiva.
-

### 3. Planteamiento del problema

El agente causal de la enfermedad de Chagas *Trypanosoma cruzi*, se presenta en la naturaleza como poblaciones de clonas, sin intercambio genético. Las clonas del parásito han evolucionado de manera independiente en tiempo y espacio, lo cual puede ser una condición negativa en la eficacia de la aplicación de un reactivo diagnóstico para control y vigilancia epidemiológica de la enfermedad. Esto justifica investigar si los aislados de *Trypanosoma cruzi* de diferentes regiones de la República Mexicana presentan diversidad de expresión en sus perfiles electroforéticos de proteínas, glicoproteínas y lipoproteínas y evaluar la posible implicación de esta diversidad en el diseño de reactivos diagnósticos.

---



## 4. Objetivos

- Investigar si los diferentes aislados estudiados de la República Mexicana son parte de una población de *Trypanosoma cruzi* con estructura clonal, en función de su diversidad de expresión de proteínas, glicoproteínas y lipoproteínas.
  - Evaluar las posibles implicaciones en el diseño de reactivos de uso diagnóstico.
-

## 5. Hipótesis

Si la población de *Trypanosoma cruzi* tiene una estructura clonal y ha evolucionado independientemente en tiempo y espacio, entonces se espera encontrar diversidad en los perfiles electroforéticos para proteínas, glicoproteínas y lipoproteínas.

---

## 6. Parte experimental

### 6.1. Diseño experimental

#### 6.1.1. Población

Constituida de 17 aislados y dos cepas Sudamericanas de *Trypanosoma cruzi* disponibles en el cepario del Laboratorio de la Enfermedad de Chagas del Departamento de Parasitología del Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos de la Secretaría de Salud, INDRÉ, Ssa. Tabla.2.

*Tabla 2.* Origen y localidad de los aislados mexicanos y cepas de referencia Sudamericanas estudiados.

AISLADO	ORIGEN	LOCALIDAD
GOM	Humano	Chiapas
Acapulco	Humano	Guerrero
Petaquillas	Vector	Guerrero
Cocula	Vector	Jalisco
Cc	Vector	Morelos
Progreso	Vector	Morelos
Morelos	Humano	Morelos
CID	Humano	Oaxaca
MIGUZ	Humano	Oaxaca
NINOA	Humano	Oaxaca
Tab	Humano	Tabasco
CH30	Vector	Veracruz
Hy	Vector	Yucatán
Jerbo	Humano	Yucatán
Yucatán		Yucatán
OLEA	Humano	Yucatán
Zacatecas	Humano	Zacatecas
Y	Humano	Brasil
Tutahuen	Vector	Chile

### **6.1.2. Criterios**

Criterio de Inclusión: se utilizaron los cultivos de aislados que cumplieron con los lineamientos establecidos en los procedimientos estándares del laboratorio referentes a su cultivo y conservación:

- Medio de cultivo apropiado.
- Cultivos no contaminados.
- Cultivos en fase de crecimiento exponencial.

Criterio de Exclusión: aquellos cultivos que no cumplieron lo establecido en los procedimientos estándares de cultivo y conservación.

Criterio de Eliminación: aquellos cultivos que no estén perfectamente documentados.

### **6.1.3. Variables**

Perfiles electroforéticos de proteínas, glicoproteínas y sialolipoproteínas/lípidos Lugar de origen, hospedero humano o vector.

### **6.1.4. Tipo de estudio**

Encuesta descriptiva, criterios; observacional, prospectivo, transversal y descriptivo.

## **6.2. Materiales y equipo**

1. Agitador: Felisa FE-311
  2. Balanza analítica: Precisa 180ADDP050.
-

3. Embudo de vidrio.
4. Equipo de electroforesis: Gibco BRL Mini-V810.
5. Espectrofotómetro, Milton Roy Spectronic 21D.
6. Fuente de poder: Bio-Rad 200/2.0 Power supply.
7. Matraz volumétrico de 100, 500 y 1000 mL.
8. Micropipetas de volumen variable de 5-20, 50-200 y 1000µL. Eppendorf
9. Papel filtro whatman poro mediano.
10. Pipeta serológica graduada de 0.5, 1.0, 5.0 y 10.0 mL.
11. Potenciómetro: HANNA H18521
12. Vaso de precipitado de 25,50, 100,250, 500 y 1000 mL.

### 6.3. Reactivos

1. Acetato de sodio trihidratado (Merck, Lot. TA204568).
2. Acido acético glacial (PQM, Lot. 623524)
3. Acido clorhídrico 37% (Merck, Lot. 821)
4. Acido nítrico 65% (Merck, Lot.25645)
5. Acido peryódico (Merck, Lot. 515B495924).
6. Acrilamida (Sigma, Lot. 62H01651).
7. Albúmina sérica bovina (Sigma, Lot. 73H0341).
8. Aprotinina (RDC, Lot. 90218322).
9. Azul de bromofenol (Sigma, Lot. 34H35181).
10. Azul de Coomassie (Sigma, R-250.Lot ).
11. Bis-acrilamida (Bio-Rad, Lot. 47803A).
12. Carbonato de sodio (TJ Baker, Lot. M-30923).
13. Cloruro de sodio (PQM, Lot. 2490).
14. Dicromato de potasio (Baker Analyzed, Lot. M-30090).
15. EDTA (Eastman Organic Chemicals, Lot. 6354)
16. Etanol (ELSA. Lot. 261096).
17. p-fenilendiamina, Grado II. (Sigma, Lot. 18B0470)

- 
18. Fenol-Ciocalteu (Sigma, Lot. 62H5034).
  19. Fluoruro de fenilmetilsulfonilo (Sigma, Lot. 103H0993).
  20. Formaldehído 37% (Merck, Lot. 505134N).
  21. Glicerol (Sigma, Lot. 46H06575).
  22. Glicina (Sigma, Lot. 113H12551).
  23. Peróxido de hidrógeno (Sigma, Lot. 2569)
  24. Lauril sulfato de sodio (Sigma, Lot. 72H-059915).
  25. Marcadores de Peso Molecular 10-250 kDa (Bio-Rad, Lot. L1610362).
  26. Metanol (Reproquif, Lot. RA20070).
  27.  $\beta$ -mercaptoetanol (Sigma, Lot. 53H074115).
  28.  $\alpha$ -Naftol 99% (Sigma, Lot 36587)
  29. Nitrato de plata 99% (Sigma, Lot. 45H3497)
  30. Peróxido de hidrógeno 30% (Sigma, Lot. 2893)
  31. Persulfato de amonio (Bio-Rad, Lot. 122082E).
  32. Sulfato de cobre (Sigma, Lot. 5698)
  33. Tartrato de sodio y potasio (Merck, Lot. 212408).
  34. TEMED (N,N,N',N'-tetrametil etilén diamina) grado electroforesis (Bio-Rad, Lot. 568745E)
  35. Tioglicolato de sodio (Bioxon, Lot. 164-2).
  36. Tris base (Sigma, Lot. 7664).
  37. Yodoacetamida (Sigma, Lot. 75H5058).

## 6.4. Método

### 6.4.1. Obtención de extracto puro a partir de epimastigotes de *Trypanosoma cruzi*

1. A un gramo de masa húmeda del parásitos se agregan 10 mL TBS (tris base 100 mM, NaCl 0.15 M, pH 7.5) tioglicolato de sodio 1/20 000.
  2. Resuspender y dejar durante 1 hr a 4°C.
-

3. Al término centrifugar por 15 minutos a 3500 rpm a 4°C.
4. Recuperar el sobrenadante y filtrar por membrana con poro de 0.45  $\mu\text{m}$ .
5. Agregar 5  $\mu\text{L}$  de PI-A, PI-B y aprotinina por cada mL de extracto del parásito.
6. Fraccionar y almacenar a -70°C.

#### 6.4.2. Determinación de la concentración de proteínas por el método de Lowry

1. Construir una curva estándar de 5 a 200  $\mu\text{g}$  de proteína por mL y preparar en 1 mL de agua la dilución de la muestra problema.

*Curva estandar*

Tubo $\mu\text{g}$	1 (0 $\mu\text{g}$ )	2 (5 $\mu\text{g}$ )	3 (10 $\mu\text{g}$ )	4 (20 $\mu\text{g}$ )	5 (40 $\mu\text{g}$ )	6 (80 $\mu\text{g}$ )	7 (100 $\mu\text{g}$ )	8 (200 $\mu\text{g}$ )	9
$\mu\text{L}$ Agua	1000	995	990	980	960	920	900	800	Dilución problema
$\mu\text{L}$ BSA	0	5	10	20	40	80	100	200	0
Reactivo A*	3000	3000	3000	3000	3000	3000	3000	3000	3000
Reactivo B**	300	300	300	300	300	300	300	300	300

Nota: La solución de proteínas utilizada es albúmina sérica bovina (BSA) a una concentración de 1 mg/mL.

2. Agregar el reactivo A\* e incubar 10 minutos a temperatura ambiente, al término, adicionar el reactivo B\*\* e incubar 30 minutos a temperatura ambiente.
3. Leer a 500 nm de longitud de onda. Con el tubo 1 se calibra a cero de absorbancia (100% de transmitancia) y se leen los tubos de la curva estándar y muestra problema.

Para determinar la concentración de proteínas, se calculan los estimadores de los parámetros  $m$  =pendiente y  $b$  = ordenada al origen de la relación lineal  $y=mx+b$ , se despeja  $x$ , se sustituyen los valores  $m$ ,  $b$  e  $y$  (absorbancia muestra problema) y se realizan las operaciones indicadas.

---

La concentración de proteínas obtenida corresponde a la dilución ensayada de la muestra problema, éste valor tiene que ser multiplicado por el factor de dilución para conocer la concentración de la solución sin diluir.

#### **6.4.3. Electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones reductoras (PAGE-SDS 11%, glicerol 10%)**

1. Llevar los reactivos a temperatura ambiente.
  2. Armar el equipo de electroforesis de acuerdo a las instrucciones del fabricante.
  3. Verificar que no exista fuga al agregar agua entre los vidrios, eliminar esta y secar los compartimentos con papel filtro.
  4. Agregar en un matraz limpio cada reactivo para formar el gel separador y vaciar la mezcla entre los vidrios hasta el nivel deseado.
  5. Agregar lentamente unas gotas de agua destilada para permitir la formación de un límite superior regular en el gel separador. El tiempo de polimerización es entre 10-20 minutos.
  6. Eliminar el agua y secar con papel filtro.
  7. En un matraz limpio se agregan los reactivos para formar el gel concentrador, la mezcla se vierte hasta el borde superior de los vidrios y se coloca el peine, la polimerización ocurre en aproximadamente 10 minutos.
- Nota: La cantidad de proteínas para un minigel de 7x10 cm, 0.75 mm de espesor y un peine de diez carriles es de 10 µg/carril.
8. En un vial se deposita el volumen correspondiente a 10 µg del extracto rico en proteínas, se agrega un volumen igual de regulador de muestra 2X y se incuba 5 minutos en un baño de agua en ebullición.
  9. Preparar el regulador de corrimiento.
  10. Al término de la polimerización, retirar los peines y lavar con agua.
-



11. Ensamblar el equipo de electroforesis siguiendo las instrucciones del fabricante.
12. Agregar el regulador de corrimiento. Para los equipos de electroforesis de dos compartimentos, el regulador del interior debe ser nuevo en cada corrida y el exterior puede usarse 3 ó 4 veces, y en los diseños con un sólo compartimento el regulador se usa una sola vez.
13. Colocar cuidadosamente el extracto en los carriles deseados, si el volumen de la mezcla al diluirla con el regulador de muestra es más que la capacidad del pozo, colocar el máximo volumen y después de un tiempo de corrimiento agregar el resto de la muestra.
14. Colocar los marcadores de peso molecular de acuerdo a las recomendaciones del fabricante.
15. Conectar los cables a la fuente de poder y ajustar el voltaje a 100 volts hasta que el frente iónico pase el límite inferior del gel concentrador, en este momento se ajusta el voltaje a 150 volts hasta que el frente iónico alcance el límite inferior del gel separador.
16. Al término se procede a retirar el gel del equipo de electroforesis y se transfiere a un recipiente apropiado para su tinción.

#### **6.4.4. Tinción con azul de Coomassie**

1. Colocar en un recipiente el gel y 50 mL de colorante de trabajo de azul de Coomassie e incubar a 37 °C 60 minutos. Al término recuperar el colorante.
2. Agregar 50 mL de solución decolorante y cambiar las veces necesarias hasta observar la nitidez de las bandas.

NOTA: El colorante de trabajo puede usarse hasta 5 veces al igual que la solución decolorante que se filtra por carbón activado para eliminar el colorante.

---

---

#### **6.4.5. Tinción de carbohidratos. Oxidación p-fenilendiamina**

1. Sumergir el gel durante 30 minutos en solución A.
2. Lavar con 50 mL de agua destilada durante 10 minutos.
3. Sumergir por 60 minutos en una solución fresca de B+C+D a una proporción de 5:5:1 por volumen.
4. Lavar por 10 minutos en agua corriente y finalmente con agua destilada.
5. Deshidratar el gel o digitalizar la imagen.

#### **6.4.6. Doble tinción: proteínas y sialoglicoproteínas/lípidos en geles de poliacrilamida.<sup>54</sup>**

1. Fijar el gel en 50 mL de metanol al 40% (v/v) más ácido acético glacial al 10% (v/v) durante una hora a temperatura ambiente.

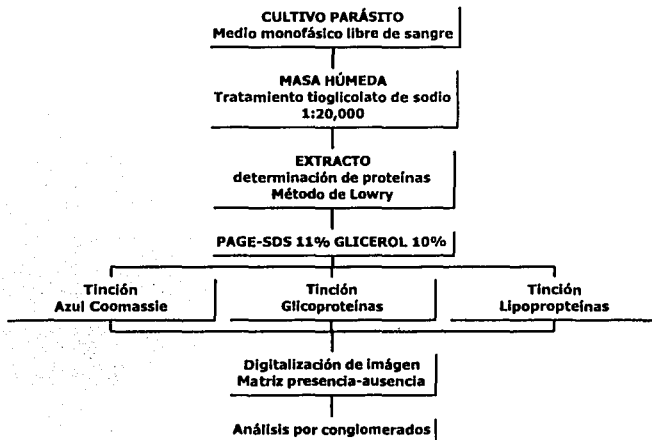
Nota: Para eliminar el SDS se lava 2 veces con 50 mL etanol 10% (v/v) más ácido acético glacial al 5% (v/v) durante 30 minutos a temperatura ambiente.

2. El gel se equilibra con 40 mL de solución oxidante (3.4 mM de dicromato de potasio más 3.2 mM de ácido nítrico) durante 10 minutos a temperatura ambiente.
  3. Se lava tres veces con 50 mL de agua destilada hasta que el fondo del gel se observe claro.
  4. El gel se transfiere a 40 mL de nitrato de plata 20 mM durante 30 minutos,
  5. Al término se lava tres veces con 50 mL de agua destilada, cada lavado debe ser de un minuto.
  6. El desarrollo del color de las bandas se inicia al agregar 40 mL de una solución caliente (40°C) del reactivo de desarrollo (0.28 M de carbonato de sodio más 0.008% de p-formaldehído) , la cual se cambia dos o tres veces
-

cuando ésta sea de color café. Las bandas positivas son de color amarillo y las imágenes ópticas negativas de las bandas no teñidas aparecen en una hora aproximadamente.

7. La solución de lavado se decanta, el gel se lava con agua destilada y después con 40 mL de ácido acético al 10% para incrementar el color amarillo.
8. El gel se tiñe con 40 mL de azul de Coomassie 0.1% (p/v), metanol 25% (v/v), ácido acético 7% (v/v) durante una hora.
9. Se destiñe con metanol 25% (v/v), ácido acético 7% (v/v) hasta la definición deseada.
10. El gel se deshidrata o se digitaliza la imagen en color.

Fig. 7. Diagrama de flujo que presenta el método utilizado.



---

## 6.5. Análisis estadístico

Para conocer la diversidad de los aislados mexicanos y cepas sudamericanas se calculó el índice de similitud entre cepas sudamericana, entre aislado mexicanos con respecto a las cepas sudamericanas y entre aislado mexicanos con respecto al perfil electroforético más rico como punto de referencia. Para calcular tal índice se utilizó el programa RFLPscan plus versión 3.0 para Windows, en donde primero compara todos los perfiles electroforéticos simultáneamente al parear las bandas con una tolerancia del 1% (Match) donde el límite superior es determinado al multiplicar su peso molecular (PM) por  $(1+\text{tolerancia})$  y el límite inferior al multiplicar el PM por  $(1-\text{tolerancia})$ , una banda en particular es pareada si se localiza dentro del límite superior e inferior del pM de otra, si esto sucede la banda es asignada al mismo bin (grupo de bandas dada una posición de pariamiento), después se calcula la razón del número de bandas iguales entre los perfiles (bin) y la divide entre el número total de bandas presentes en los dos perfiles comparados. Los valores posibles son de 0 a 1, en donde 1 señala igualdad y cero lo contrario. Los valores se representan gráficamente con dos objetivos el primero para tener una panorámica general de la diversidad y el segundo para descubrir una posible agrupación.

Para determinar cuantos grupos ajenos puede haber entre los aislados estudiados y cepas de referencia se construyó una matriz rectangular de  $n \times m$  considerando una tolerancia del 1% para igualdad de bandas, en donde  $n$  son los patrones electroforéticos de cada  $m$  aislado o cepa de referencia. La matriz  $n \times m$  se transformó a una matriz triangular  $n \times n$  de similaridad, por la métrica del porcentaje de desacuerdo normalizado. Los valores corren de 0 a 100, en donde 0 señala mínima similaridad y 100 máxima similaridad. Sobre esta matriz se aplica el algoritmo de enlace de mínima varianza de Ward, que establece las reglas por las que los aislados o cepas de referencia se unirán a los grupos con

---

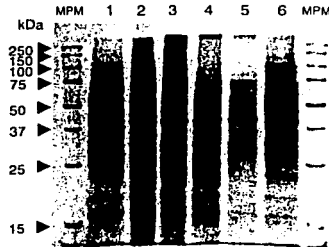
---

base en sus similitudes entre los  $n$  aislados de la matriz. Dado  $k$  subgrupos (aislados), el método de enlace de Ward permite la reducción de  $k-1$  subgrupos mutuamente excluyentes al considerar la unión de todos los posibles  $k(k-1)/2$  pares que puedan ser formados y aceptar su unión con base en un valor óptimo que minimiza la desviación de la suma de cuadrados alrededor de la media del grupo. Para realizar esta actividad se utilizó el programa de cómputo Systat versión 5.01 para Windows.

---

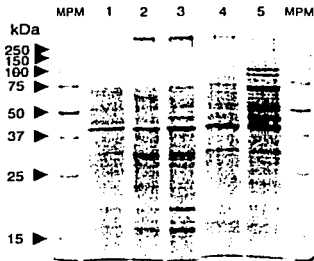
## 7. Resultados

*Perfil protéico.* De la separación protéica, glicoprotéica y sialolipoprotéica/lípidos de 17 aislados de *T. cruzi* de origen mexicano y dos cepas sudamericanas se observó lo siguiente: Después de la electroforésis en condiciones reductoras (PAGE-SDS al 11%, Glicerol 10%) se realizó la tinción por el método de azul de Coomassie para conocer los diversos perfiles de bandedo protéico en cada uno de los aislados mexicanos y cepas de referencia internacional Fig 8a, 8b, 8c, 8d y 8e.

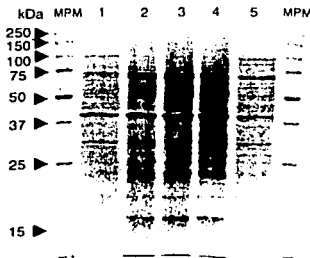


TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

**Fig. 8a** PAGE-SDS al 11%, Glicerol al 10% de proteínas totales de epimastigotes de *Trypanosoma cruzi*, teñido para proteínas con Azul de Coomassie. 1) Y, aislado Humano, localidad Brasil, 2) OLEA aislado humano, localidad Yucatán, 3) CID; aislado humano, localidad Oaxaca; 4) Cc aislado vector, localidad Morelos; 5) CH30, aislado vector, localidad Veracruz y 6) Tulahuen; aislado vector, localidad Chile. MPM; marcadores de peso molecular.



**Fig. 8b** PAGE-SDS al 11%, Glicerol al 10% de proteínas totales de epimastigotes de *Trypanosoma cruzi*, teñido para proteínas con azul de Coomassie. 1) Y, aislado Humano, localidad Brasil., 2) Cocula; aislado vector, localidad Jalisco, 3) Hy; aislado vector, localidad Yucatán, 4) Jerbo; aislado humano, localidad Yucatán y 5) Tulahuen; aislado vector, localidad Chile. MPM; marcadores de peso molecular.



**Fig. 8c** PAGE-SDS al 11%, Glicerol al 10% de proteínas totales de epimastigotes de *Trypanosoma cruzi*, teñido para proteínas con azul de Coomassie. 1) MIGUZ; aislado humano, localidad Oaxaca, 2) Zacatecas; aislado humano localidad Zacatecas, 3) Petaquillas; aislado vector, localidad Guerrero, 4) NINOA; aislado humano, localidad Oaxaca y 5) Tuluahuén; aislado vector, localidad Chile. MPM; marcadores

TESIS CON  
FALTA DE ORIGEN

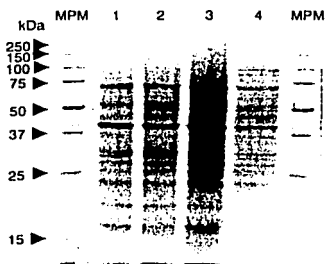


Fig. 8d. PAGE-SDS al 11%, Glicerol al 10% de proteínas totales de epimastigotes de *Trypanosoma cruzi*, teñido para proteínas con azul de Coomassie. 1) GOM; aislado humano, localidad Chiapas, 2) Tabasco; aislado humano localidad Tabasco, 3) Acapulco; aislado humano, localidad Guerrero y 4) Tlahuén; aislado vector, localidad Chile. MPM; marcadores de peso molecular.

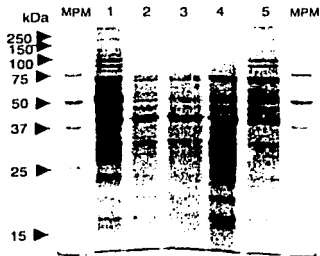
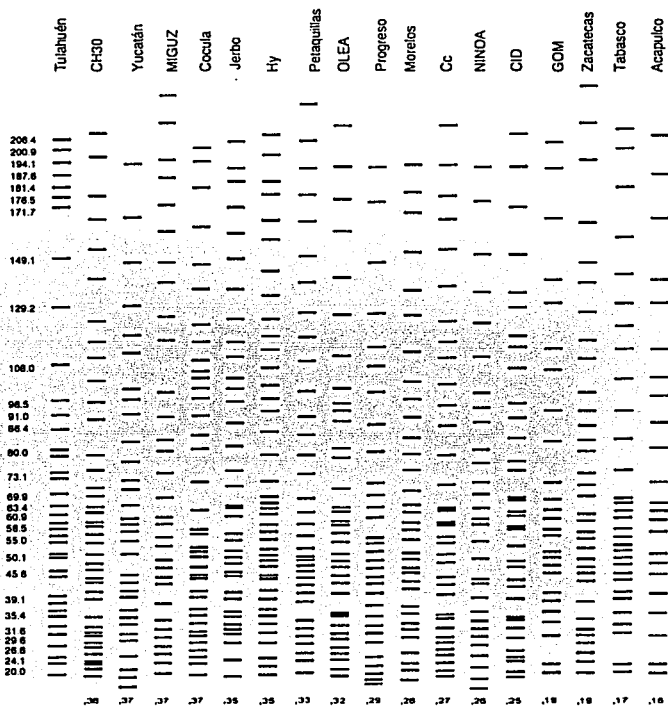


Fig. 8e PAGE-SDS al 11%, Glicerol al 10% de proteínas totales de epimastigotes de *Trypanosoma cruzi*, teñido para proteínas con azul de Coomassie. 1) Progreso; aislado vector, localidad Morelos, 2) Morelos; aislado humano, localidad Morelos, 3) Y; aislado humano, localidad Brasil y 4) Yucatán; aislado no se conoce, localidad Yucatán y Tlahuén; aislado vector, localidad Chile MPM; marcadores de peso molecular.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



Con base a los resultados de la tinción para proteínas y un pareamiento del 1% se construyó un mapa de bandeo de los patrones electroforéticos y se calculó el índice de similitud de los aislados mexicanos con respecto a la cepas de referencia chilena (Fig. 9a) y brasileña (Fig. 9b). También se elaboro un mapa de bandeo para las cepas de referencia Fig 9c.



TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Figura 9a. Mapa de bandeo de los perfiles revelados por la tinción con azul de Coomassie de 17 aislados mexicanos y la cepa de referencia Chilena, en la parte inferior se muestra la similitud con respecto a la referencia.

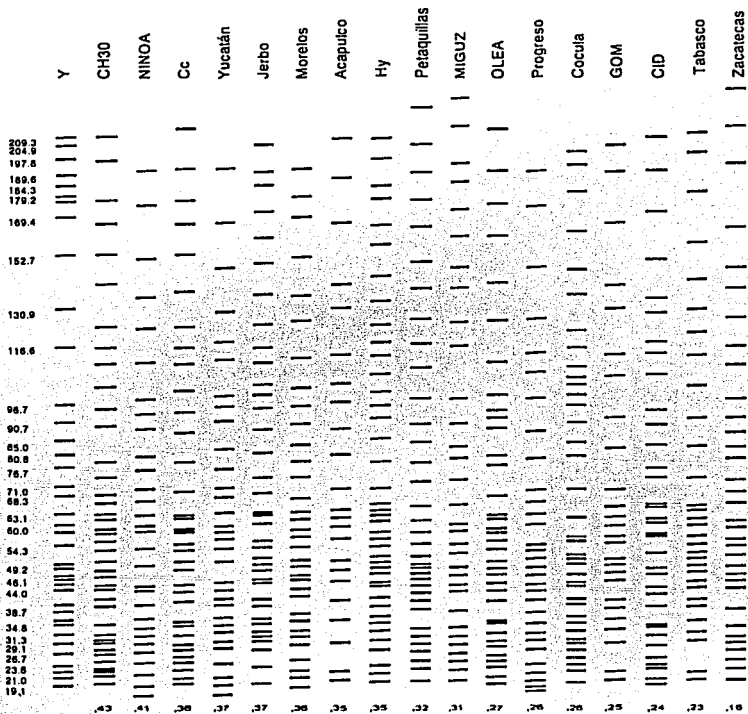


Figura 9b. Mapa de bandedo revelado por la tinción con azul de Coomassie de 17 aislados mexicanos y la cepa de referencia brasileña, en la parte inferior se muestra la similitud con respecto a la referencia.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

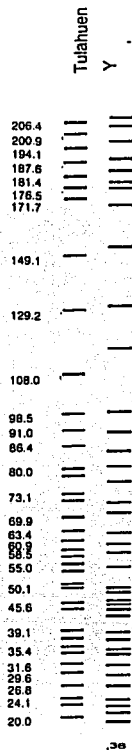
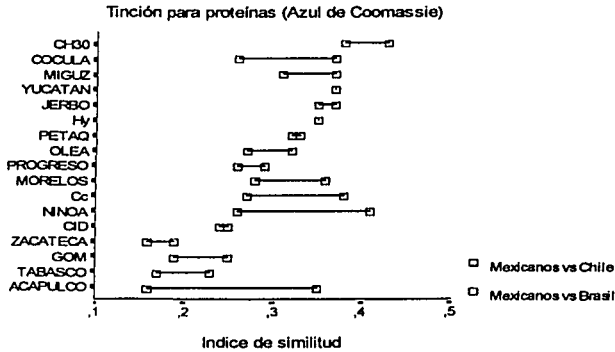


Figura 9c. Mapa de bandeado revelado por la tinción con azul de Coomassie de las cepas de referencia Sudamericanas, en la parte inferior se muestra el índice de similitud.

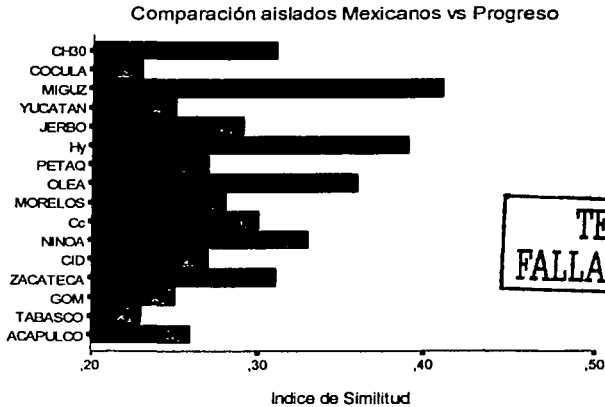
TESIS CON  
 FALLA DE ORIGEN

### Comparación aislados Mexicanos vs cepas de referencia



**Gráfica 1.** Índices de similitud de los perfiles proteicos en 17 aislados mexicanos con respecto a las cepas sudamericanas.

**Gráfica 2.** Variabilidad de los aislados mexicanos con respecto al perfil protéico más rico.



TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

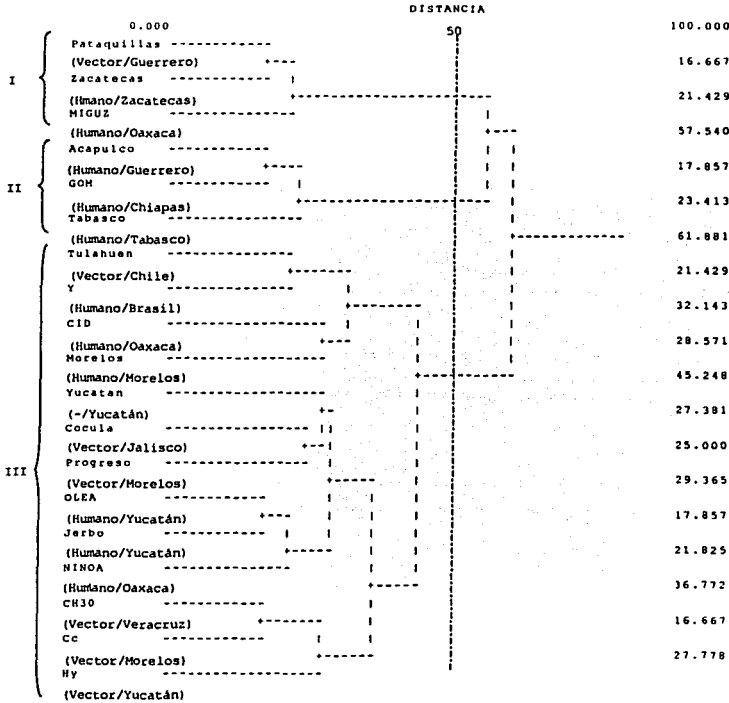
En función de los patrones de bandeo de aislados y cepas de referencia se diseñó una matriz rectangular de  $n \times m$  en donde  $n$  son los patrones electroforéticos y  $m$  es el aislado o cepa de referencia (Tabla3).

PM	OLEA	CID	Cc	CH30	Cocula	Hy	Jerho	MIGUZ	Zacatecas	Petaquillas	NINGA	GOM	Tehuacan	TulaHuán	Acapulco	Progreso	Marelas	Yucatán	
237,8-237,8	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
232,0-232,0	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
226,8-226,8	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
215,7-214,2	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
212,2-212,2	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
209,7-208,7	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
206,4-204,9	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
201,7-200,9	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
196,2-191,3	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
189,6-186,3	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
184,6-184,3	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
181,7-181,4	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
178,2-171,7	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
169,6-169,4	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
167,1-164,9	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
163,0-163,0	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
161,1-160,2	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
158,3-157,4	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
153,0-149,1	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
147,6-146,6	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
144,0-144,0	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
142,7-142,7	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
141,3-139,1	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
137,7-137,7	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
136,5-134,1	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
131,2-129,2	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
127,6-122,2	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
118,6-116,4	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
114,5-109,4	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
108,0-105,9	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
103,8-102,4	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
101,4-101,1	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
100,1-98,5	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
97,6-97,6	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
96,7-93,6	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
92,6-92,5	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
91,4-87,5	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
86,4-85,8	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
85,0-82,5	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
81,2-79,5	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
78,8-77,7	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
76,7-76,1	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
74,0-73,9	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
73,1-72,7	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
71,3-67,8	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
66,9-65,2	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
64,4-57,7	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
57,1-56,8	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
56,3-51,5	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
51,0-49,9	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
49,2-46,0	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
45,6-41,6	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
41,1-41,1	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
40,7-39,6	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
39,1-38,4	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
37,9-37,7	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
37,3-36,6	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
35,8-34,8	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
34,5-33,0	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
32,6-30,9	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
30,3-28,6	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
28,1-28,1	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
27,7-27,7	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
27,4-27,4	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
27,1-27,1	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
26,8-26,5	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
26,0-25,8	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
25,3-23,6	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
23,2-23,2	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
22,9-22,4	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
22,1-22,1	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
21,8-21,8	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
21,5-21,4	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
21,2-21,2	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
21,0-21,0	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
20,8-20,3	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
20,1-20,0	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
19,8-19,6	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
19,4-19,4	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
19,2-18,1	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
18,9-18,9	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
17,9-17,9	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
17,2-17,2	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
17,0-17,0	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

Tabla 3. Matriz presencia-ausencia del perfil de bandedo por la tinción azul de Coomassie en 17 aislados mexicanos y dos cepas de referencia Sudamericanas. ( + ; presencia, - ausencia )

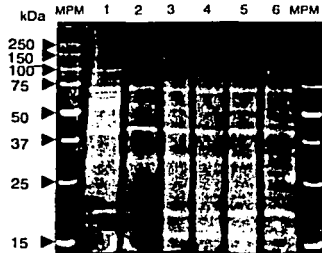
A partir de la matriz nxm se calcula el índice de similitud de los aislados mexicanos y cepas de referencia utilizando la métrica del porcentaje de desacuerdo normalizado, en estos valores (matriz nxn, en donde n son los aislados o cepas de referencia) se aplica el algoritmo de enlace de mínima varianza de Ward que agrupa a los aislados y cepas de referencia de acuerdo a sus similitudes, Fig. 10.



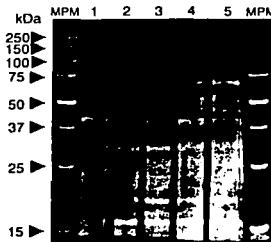
TESIS CON  
 FALLA DE ORIGEN

Fig 10. Dendrograma basado en la métrica de porcentaje de desacuerdo normalizado y el método de mínima varianza de Ward. A un 50% de similitud se formaron tres grupos : Grupo I; constituido por MIGUZ, Zacatecas y Petaquillas, Grupo II; Acapulco, GOM y Tabasco, Grupo III; Hy, Cc, CH30, NINOA, Jerbo, OLEA, Progreso, Cocula, Yucatán, Morelos, CID, Brasil y Chile.

**Perfil glicoprotéico.** Después de la electroforesis en condiciones reductoras (PAGE-SDS al 11%, Glicerol 10%) se realizó la tinción por el método de oxidación de p-fenilendiamina para conocer los diversos perfiles de bandeo glicoprotéico en cada uno de los aislados mexicanos y cepas de referencia internacional Fig 11a, 11b, 11c, 11d y 11e.

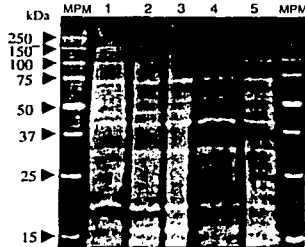


**Fig. 11a** PAGE-SDS al 11%, Glicerol al 10% de proteínas totales de epimastigotes de *Trypanosoma cruzi*, teñido para polisacáridos por la reacción de oxidación de p-fenilendiamina. 1) Y; aislado humano, localidad Brasil, 2) OLEA; aislado humano, localidad Yucatán, 3) CID; aislado humano, localidad Oaxaca, 4) Cc; aislado vector, localidad Morelos y 5) CH30; aislado vector, localidad Veracruz. Y 6) Tulahuen; aislado vector, localidad Chile. MPM; marcadores de peso molecular.

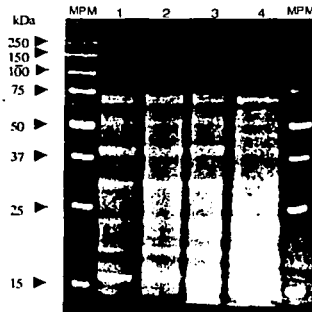


**Fig. 11b** PAGE-SDS al 11%, Glicerol al 10% de proteínas totales de epimastigotes de *Trypanosoma cruzi*, teñido para polisacáridos por la reacción de oxidación de p-fenilendiamina. 1) Y, aislado humano, localidad Brasil, 2) Cocula; aislado vector, localidad Jalisco, 3) Hy; aislado vector, localidad Yucatán, 4) Jerbo; aislado humano, localidad Yucatán y 5) Tulahuen; aislado vector, localidad Chile. MPM; marcadores de peso molecular.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



**Fig. 11c** PAGE-SDS al 11%, Glicerol al 10% de proteínas totales de epimastigotes de *Trypanosoma cruzi*, teñido para polisacáridos por la reacción de oxidación de p-fenilendiamina. 1) MIGUZ; aislado humano, localidad Oaxaca, 2) Zacatecas; aislado humano, localidad Zacatecas, 3) Petaquillas; aislado vector, localidad Guerrero, 4) NINOA, aislado humano, localidad Oaxaca y 5) Tulahuen; aislado vector, localidad Chile. MPM; marcadores de peso molecular.



**Fig. 11d** PAGE-SDS al 11%, Glicerol al 10% de proteínas totales de epimastigotes de *Trypanosoma cruzi*, teñido para polisacáridos por la reacción de oxidación de p-fenilendiamina. 1) GOM; aislado humano, localidad Chiapas, 2) Tabasco; aislado humano localidad Tabasco, 3) Acapulco; aislado humano, localidad Guerrero y 4) Tulahuen; aislado vector, localidad Chile. MPM; marcadores de peso molecular.

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**



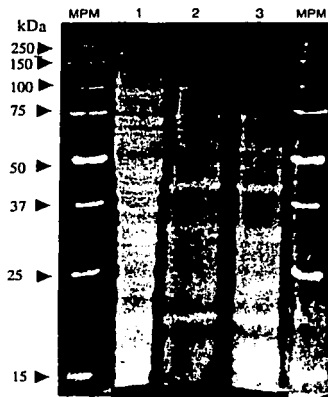


Fig. 11e PAGE-SDS al 11%, Glicerol al 10% de proteínas totales de epimastigotes de *Trypanosoma cruzi*, teñido para polisacáridos por la reacción de oxidación de p-fenilendiamina. 1) Progreso; aislado vector, localidad Morelos, 2) Morelos; aislado humano localidad Morelos y 3) Yucatán; localidad Yucatán. MPM; marcadores de peso molecular.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Con base en los resultados de la tinción para proteínas y un pareamiento del 1% se construyó un mapa de bandeo de los patrones electroforéticos y se calculó el índice de similitud de los aislados mexicanos con respecto a las cepas de referencia chilena (Fig. 12a) y brasileña (Fig. 12b). También se construyó un mapa de bandeo para las cepas de referencia Fig 12c.

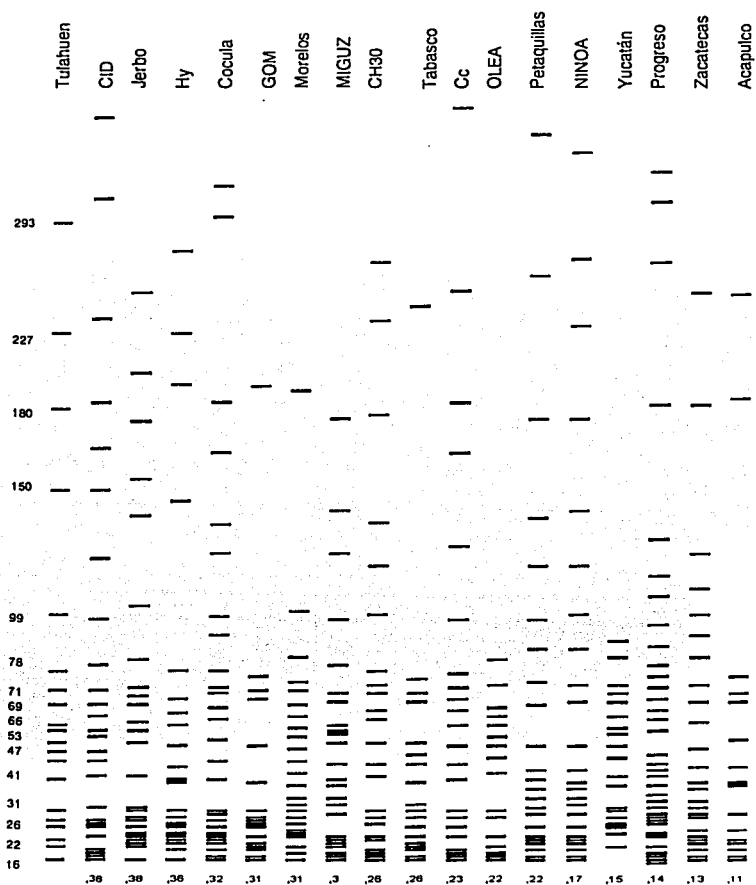


Fig. 12a: Mapa de bandeo revelado por la reacción de oxidación con p-fenilendiamina en 17 aislados mexicanos y la cepa de referencia Chilena, en la parte inferior se muestra la similitud con respecto a la referencia.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

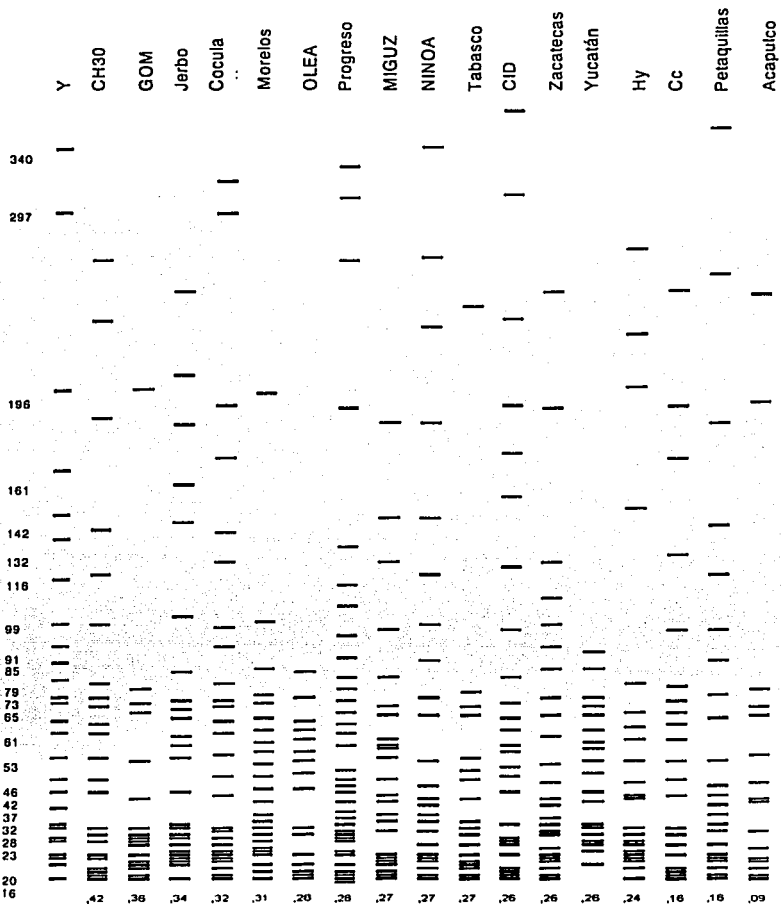


Fig. 12b: Mapa de bandeo revelado por la reacción de oxidación de p-fenilendiamina en 17 aislados mexicanos y la cepa de referencia brasileña, en la parte inferior se muestra la similitud con respecto a la referencia.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

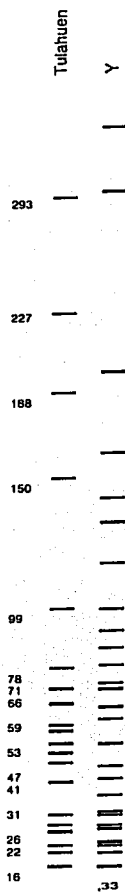
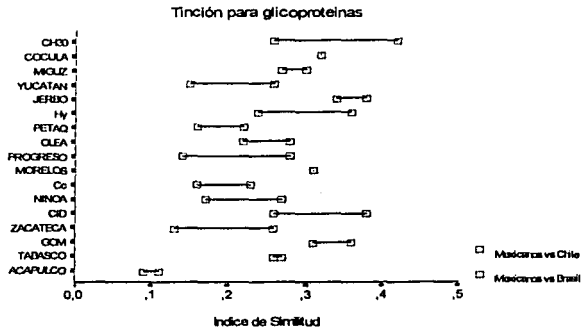
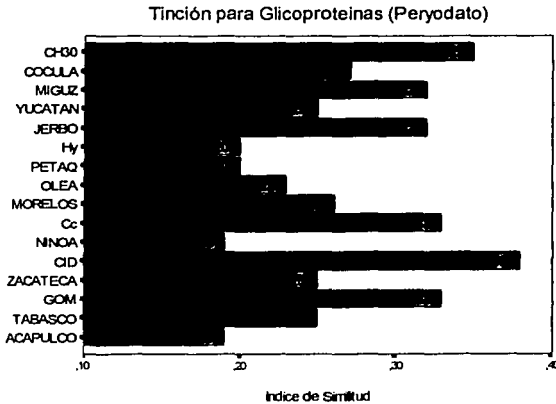


Fig. 12c: Mapa de bandeado revelado por la reacción de oxidación de p-fenilendiamina para las cepas de referencia sudamericana, en la parte inferior se muestra el índice de similitud.

Comparación aislados mexicanos vs cepas de referencia



Gráfica 3. Índices de similitud de los perfiles glicoprotéicos en 17 aislados mexicanos con respecto a cepas sudamericanas



Gráfica 4. Variabilidad de los aislados mexicanos con respecto al perfil glicoprotéico más rico.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

En función de los patrones de bandeo de aislados y cepas de referencias se diseñó una matriz rectangular de  $n \times m$  en donde  $n$  son los patrones electroforéticos y  $m$  es el aislado o cepa de referencia Tabla 4.

PA#	OLFA	CID	Ca	CHG	Carula	Hy	Jarka	MIGUZ	Zacatecas	Petaquillas	MINGA	GDM	Tehuacan	Tulaheán	Azaputén	Progress	Merofes	Yucación
342 277	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
346 268	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
350 280	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
342 240	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
346 278	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
318 318	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
346 267	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
297 297	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
275 275	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
275 275	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
240 240	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
251 249	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
275 274	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
275 274	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
275 277	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
206 206	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
200 197	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
191 191	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
186 186	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
183 185	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
183 182	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
183 169	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
167 167	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
161 161	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
151 151	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
151 150	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
147 145	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
147 144	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
126 126	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
126 126	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
122 122	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
122 123	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
121 121	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
116 116	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
116 116	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
106 106	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
106 106	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
102 102	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
100 99	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
97 97	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
97 97	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
93 93	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
89 89	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
87 87	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
86 86	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
85 85	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
82 82	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
82 82	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
78 78	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
78 78	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
76 76	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
76 76	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
72 72	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
72 72	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
71 71	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
70 70	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
68 68	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
66 66	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
66 66	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
63 63	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
63 63	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
61 61	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
60 60	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
58 58	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
57 57	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
56 56	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
55 55	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
53 53	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
53 53	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
51 51	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
50 50	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
48 48	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
47 47	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
46 46	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
46 46	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
44 44	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
43 43	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
42 42	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
42 42	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
40 40	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
38 38	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
36 36	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
34 34	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
34 33	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
34 33	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
31 31	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
30 30	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
28 28	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
27 27	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
26 26	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
25 25	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
23 23	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
23 23	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
21 21	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
20 20	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
19 19	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
17 17	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
16 16	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
15 15	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.

Tabla 4. Matriz presencia-ausencia de bandeo en la tinción por oxidación de p-fenilendiamina en 17 aislados mexicanos y dos cepas de referencia Sudamericanas. (+; presencia, - ausencia)

A partir de la matriz  $n \times m$  se calcula el índice de similitud de los aislados mexicanos y cepas de referencia utilizando la métrica del porcentaje de desacuerdo normalizado, en estos valores (matriz  $n \times n$ , en donde  $n$  son los aislados o cepas de referencia) se aplica el algoritmo de enlace de mínima varianza de Ward que agrupa a los aislados y cepas de referencia de acuerdo a sus similitudes. Fig 13.

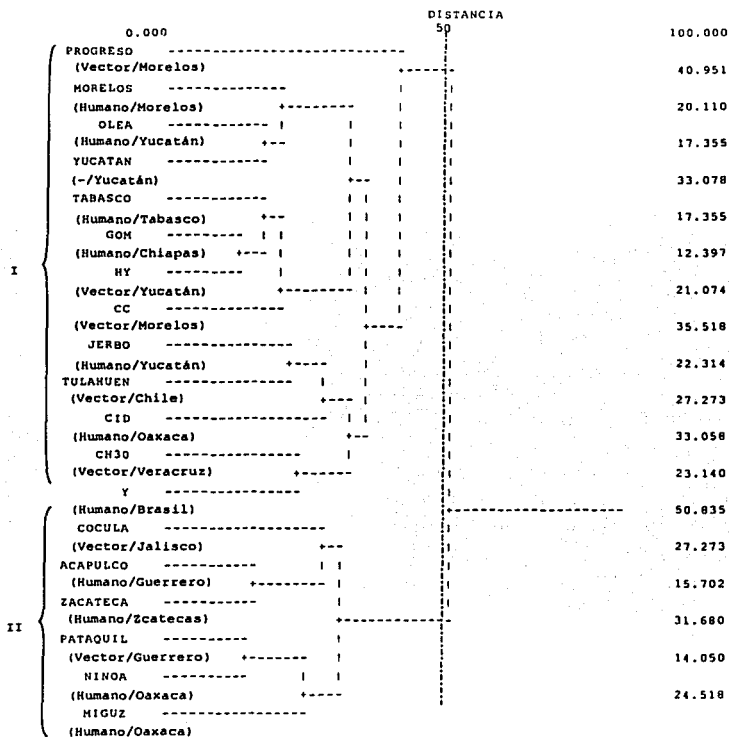
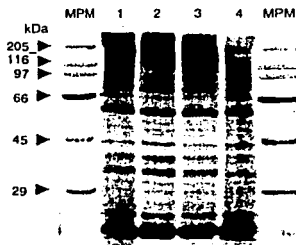
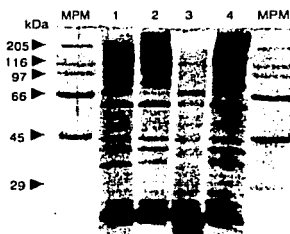


Fig. 13. Dendrograma basado en la métrica de porcentaje de desacuerdo normalizado y el método de mínima varianza de Ward. A un 50% de similitud se formaron dos grupos: Grupo I; constituido por: Progreso, Morelos, OLEA, Yucatán, Tabasco, Hy, Cc, Jerbo, Tulahuen, CID, CH30 y Y. Grupo II; formado por: Cocula, Acapulco, Zacatecas, Petaquillas, NINOA y MIGUZ.

**Perfil sialolipoproteínas-lípidos.** Después de la electroforesis en condiciones reductoras (PAGE-SDS al 11%, Glicerol 10%) se realizó la tinción doble plata-azul de Coomassie para conocer los diversos patrones de bandeos sialolipoprotéico-lípidos en cada uno de los aislados mexicanos y cepas de referencia internacional Fig 14a, 14b, 14c, 14d y 14e.



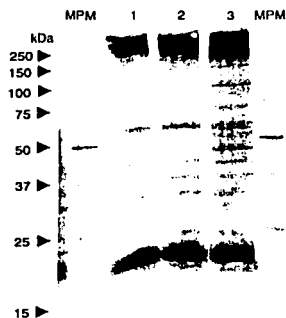
**Fig. 14a** PAGE-SDS al 11%, Glicerol al 10% de proteínas totales de epimastigotes de *Trypanosoma cruzi*, teñido para proteínas, sialolipoproteínas y lípidos 1) OLEA; aislado humano, localidad Yucatán, 2) CID; aislado humano, localidad Oaxaca, 3) Cc; aislado vector, localidad Morelos y 4) CH30; aislado vector, localidad Veracruz. MPM; marcadores de peso molecular.



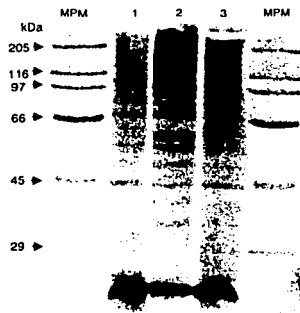
**Fig. 14b** PAGE-SDS al 11%, Glicerol al 10% de proteínas totales de epimastigotes de *Trypanosoma cruzi*, teñido para proteínas, sialolipoproteínas y lípidos. 1) Cocula; aislado vector, localidad Jalisco, 2) Hy; aislado vector, localidad Yucatán, 3) Jerbo; aislado humano, localidad Yucatán y 4) Tulahuen; aislado vector, localidad Chile. MPM; marcadores de peso molecular.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

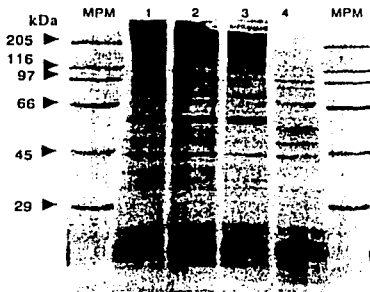




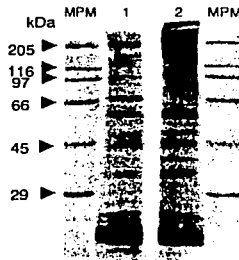
**Fig. 14c** PAGE-SDS al 11%, Glicerol al 10% de proteínas totales de epimastigotes de *Trypanosoma cruzi*, teñido para proteínas, sialolipoproteínas y lípidos. 1) MIGUZ; aislado humano, localidad Oaxaca, 2) Zacatecas; aislado humano, localidad Zacatecas y 3) Petaquillas; aislado vector, localidad Guerrero. MPM; marcadores de peso molecular.



**Fig 14d.** PAGE-SDS al 11%, Glicerol al 10% de proteínas totales de epimastigotes de *Trypanosoma cruzi*, teñido con la tinción Plata-azul de Coomassie. 1) GOM; aislado humano, localidad Chiapas, 2) Tabasco; aislado humano localidad Tabasco, 3) Acapulco; aislado humano, localidad Guerrero y Tulahuen; aislado vector, localidad Chile. MPM; marcadores de peso molecular.



**Fig. 14e.** PAGE-SDS al 11%, Glicerol al 10% de proteínas totales de epimastigotes de *Trypanosoma cruzi*, teñido para proteínas, sialolipoproteínas y lípidos. 1) Progreso; aislado vector, localidad Morelos, 2) Morelos; aislado humano localidad Morelos, 3) NINOA; aislado humano, localidad Oaxaca y 4) Yucatán; localidad Yucatán. MPM; marcadores de peso molecular.



**Fig. 14 f** PAGE-SDS al 11%, Glicerol al 10% de proteínas totales de epimastigotes de *Trypanosoma cruzi*, teñido para proteínas, sialolipoproteínas y lípidos. 1) Y; aislado humano, localidad Brasil, 2) Tulahuen; aislado vector, localidad Chile. MPM; marcadores de peso molecular.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Con base a los resultados de la tinción para sialolipoproteínas-lípidos y con un pareamiento del 1% se construyó un mapa de bandeado de los patrones electroforéticos, se calculó el índice de similitud de los aislados mexicanos con respecto a las cepas de referencia chilena (Fig. 15a) y brasileña (Fig. 15b). También se elaboró un mapa de bandeado para las cepas de referencia (Fig. 15c).

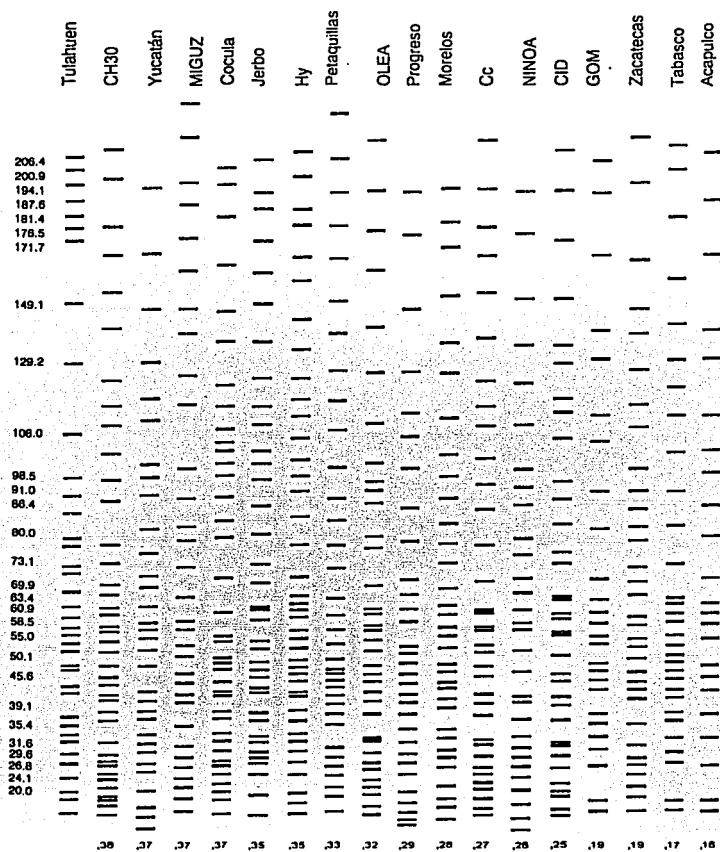


Fig. 15a: Mapa de bandeado revelado por la reacción de Dzandu K. y Col. para siallipoproteínas y lípidos en 17 aislados mexicanos y la referencia Chilena, en la parte inferior se muestra la similitud con respecto a la referencia.

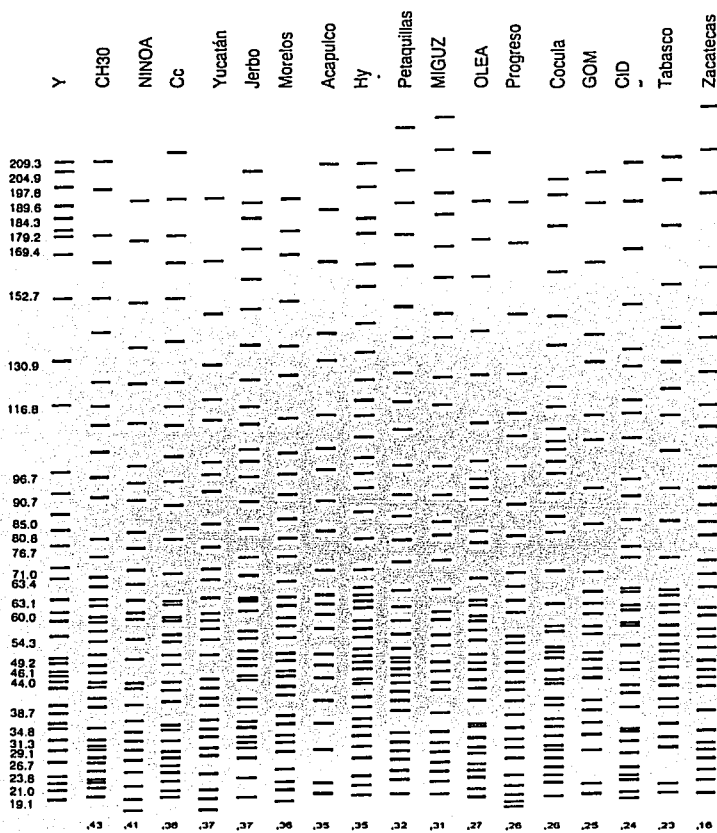


Fig. 15b: Mapa de bandedo revelado por la reacción de Dzandu K. y col. para sialilipoteínas y lípidos en 17 aislados mexicanos y la cepa de referencia brasileña, en la parte inferior se muestra la similitud con respecto a la referencia.

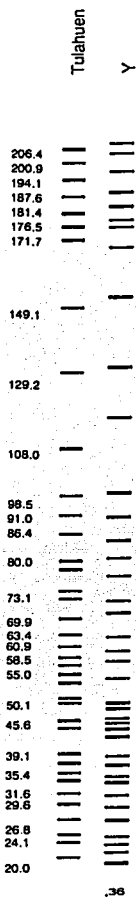
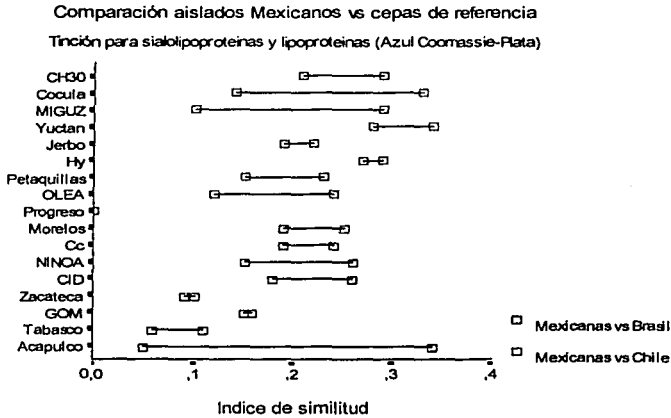
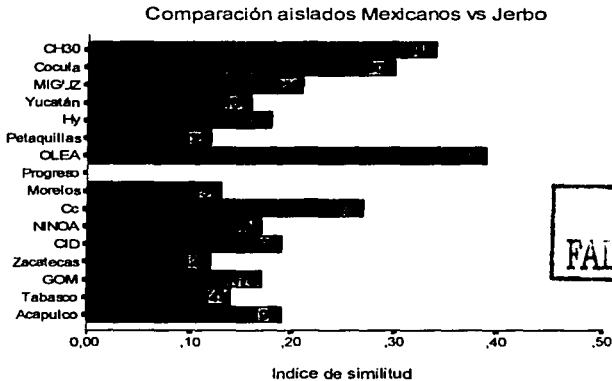


Fig. 15c: Mapa de bandeo revelado por la reacción de Dzandu K. y col. para las cepas de referencia sudamericana, en la parte inferior se muestra el índice de similitud.



Gráfica 5. Índices de similitud de los perfiles lipoprotéico-lípidos en 17 aislados mexicanos con respecto a las cepas sudamericanas



TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Gráfica 6. Variabilidad de los aislados mexicanos con respecto al perfil lipoprotéico más rico.

En función de los perfiles de bandeos de aislados y cepas de referencias se diseñó una matriz rectangular de nxm en donde n son los patrones electroforéticos y m es el aislado o cepa de referencia Tabla 5.

PN	OLTA	CB	Ca	CDR	Canaha	Ny	Juch	INCUZ	Tecocom	Petiquillo	MOCA	GOB	Talasco	Toluca	Acapulco	Progreso	Marina	Y	Yucata
137.8 41.1																			
137.8 41.2																			
137.8 41.3																			
137.8 41.4																			
137.8 41.5																			
137.8 41.6																			
137.8 41.7																			
137.8 41.8																			
137.8 41.9																			
137.8 42.0																			
137.8 42.1																			
137.8 42.2																			
137.8 42.3																			
137.8 42.4																			
137.8 42.5																			
137.8 42.6																			
137.8 42.7																			
137.8 42.8																			
137.8 42.9																			
137.8 43.0																			
137.8 43.1																			
137.8 43.2																			
137.8 43.3																			
137.8 43.4																			
137.8 43.5																			
137.8 43.6																			
137.8 43.7																			
137.8 43.8																			
137.8 43.9																			
137.8 44.0																			
137.8 44.1																			
137.8 44.2																			
137.8 44.3																			
137.8 44.4																			
137.8 44.5																			
137.8 44.6																			
137.8 44.7																			
137.8 44.8																			
137.8 44.9																			
137.8 45.0																			
137.8 45.1																			
137.8 45.2																			
137.8 45.3																			
137.8 45.4																			
137.8 45.5																			
137.8 45.6																			
137.8 45.7																			
137.8 45.8																			
137.8 45.9																			
137.8 46.0																			
137.8 46.1																			
137.8 46.2																			
137.8 46.3																			
137.8 46.4																			
137.8 46.5																			
137.8 46.6																			
137.8 46.7																			
137.8 46.8																			
137.8 46.9																			
137.8 47.0																			
137.8 47.1																			
137.8 47.2																			
137.8 47.3																			
137.8 47.4																			
137.8 47.5																			
137.8 47.6																			
137.8 47.7																			
137.8 47.8																			
137.8 47.9																			
137.8 48.0																			
137.8 48.1																			
137.8 48.2																			
137.8 48.3																			
137.8 48.4																			
137.8 48.5																			
137.8 48.6																			
137.8 48.7																			
137.8 48.8																			
137.8 48.9																			
137.8 49.0																			
137.8 49.1																			
137.8 49.2																			
137.8 49.3																			
137.8 49.4																			
137.8 49.5																			
137.8 49.6																			
137.8 49.7																			
137.8 49.8																			
137.8 49.9																			
137.8 50.0																			

Tabla 5. Matriz presencia-ausencia de bandeos en la tinción con la reacción de Dzandu y col. en 17 aislados mexicanos y dos cepas de referencia Sudamericanas. (+; presencia, - ausencia).

A partir de la matriz nxm se calcula el índice de similitud de los aislados mexicanos y cepas de referencia utilizando la métrica del porcentaje de desacuerdo normalizado, en estos valores (matriz nxn, en donde n son los aislados o cepas de referencia) se aplica el algoritmo de enlace de mínima varianza de Ward que agrupa a los aislados y cepas de referencia de acuerdo a sus similitudes Fig.16.

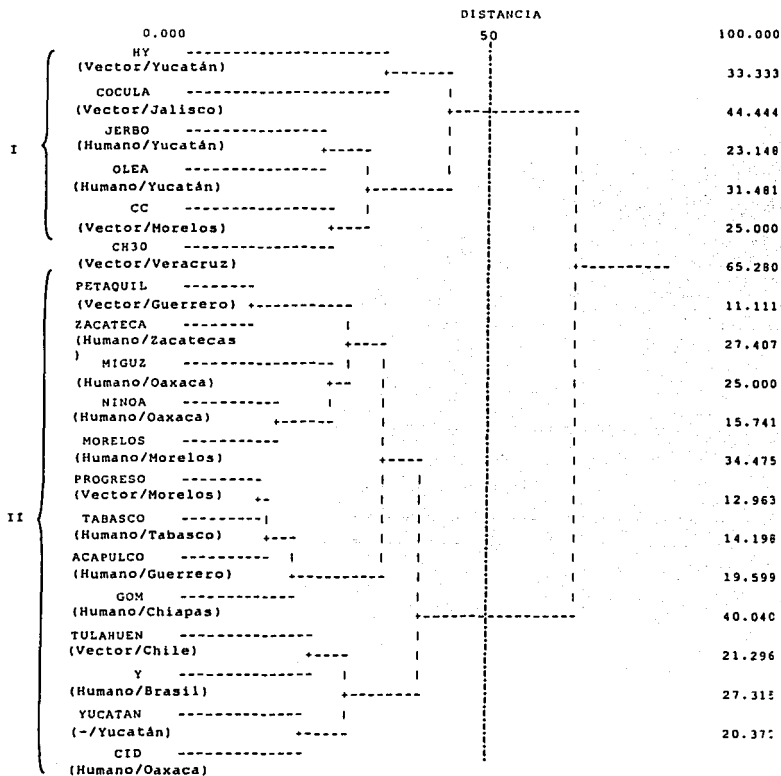


Fig. 16. Dendrograma basado en la métrica de porcentaje de desacuerdo normalizado y el método de mínima varianza de Ward. A un 50% de similitud se formaron dos grupos: Grupo I; constituido por: Hy, Cocula, Jerbo, OLEA, Cc, CH30; Grupo II formado por: Petaquillas, Zacatecas, MIGUZ, NINOA, Morelos, Progreso, Tabasco, GOM, Tulahuen, Y, Yucatán y CID



## 8. Análisis de resultados

Sí la población de *T. cruzi* tiene una estructura clonal la observación basada en un grupo de características genéticas independientes puede inferir similar relación genética entre grupos de aislados naturales. Esta predicción ha sido observada en *Trypanosoma cruzi* con una alta significancia estadística cuando se correlacionan los patrones de isoenzimas y DNA del cinetoplasto.<sup>24,26</sup> De acuerdo a lo anterior se estudiaron los perfiles electroforéticos de 17 aislados mexicanos y dos cepas de referencia sudamericanas para investigar el impacto de la estructura clonal en la expresión de proteínas, glicoproteínas y sialolipoproteínas-lípidos y que implicación directa podría tener sobre las bondades al diseñar reactivos diagnósticos. En cuanto al corrimiento electroforético y proceso de tinción podemos decir que nuestros resultados son confiables ya que observamos semejanza en los perfiles electroforéticos de la cepa Sudamericana analizada en ensayos independientes. Con los perfiles electroforéticos se construyeron las tablas de objetos-variables para proteínas, glicoproteínas y sialolipoproteínas-lípidos en donde los objetos son los aislados o cepas de referencia y las variables son la presencia-ausencia de una banda para un peso molecular en particular (Tablas 3 , 4 y 5).

*Tinción para proteínas.* Con las tablas de objetos-variables generamos una representación gráfica de todos los aislados estudiados y cepas de referencia. Al comparar las cepas Sudamericanas entre ellas, Brasil (aislada de caso agudo) y Chile (aislada de *Triatoma infestans*) ambas pertenecientes al grupo II<sup>46</sup> se calculó un índice de similitud de 0.36, este resultado es consistente con lo esperado bajo el supuesto de que la población de *Trypanosoma cruzi* tiene una estructura clonal, de lo contrario se esperarí un índice mayor (Fig. 9c). Al evaluar la igualdad de los perfiles electroforéticos de los aislados

---

mexicanos y las cepas Sudamericanas se observó índices de similitud que van de 0.16 a 0.38 con respecto a la cepa Chilena (Fig 9a) y de 0.16 a 0.43 para la cepa brasileña (Fig. 9b). Los datos sugieren la presencia de tres grupos; uno constituido por Yucatán, Jerbo, Hy, Petaquillas, Progreso y CID con índices de similitud igual para las dos cepas Sudamericanas (con fines comparativos se considera la igualdad si se presenta un coeficiente de variación menor o igual al 5%), otro que contiene a CH30, Morelos, Cc, NINOA, GOM, Tabasco y Acapulco en donde la similitud es mayor a la cepa brasileña y un tercero que agrupa a Cocula, MIGUZ, OLEA, Progreso y Zacatecas con similitud mayor a la cepa chilena (Gráfica 1).

Al comparar los aislados mexicanos y tomando como referencia el perfil electroforético más rico (aislado Progreso) se observaron diferencias que van de un 77 (índice de similitud = 0.23) a un 59% (índice de similitud = 0.41) (Gráfica2). Los resultados de la variabilidad de los aislados mexicanos sugieren la presencia de una estructura jerárquica. Esta fue investigada por la técnica de análisis por conglomerados para la formación de grupos de acuerdo a su semejanza o diferencias y utilizando la métrica de porcentaje de desacuerdo normalizado para calcular índices de disimilaridad y el enlace de mínima varianza de Ward.

Con este algoritmo se formaron tres grupos definidos al considerar un 50% de similaridad: Grupo I constituido por MIGUZ, Zacatecas y Petaquillas, Grupo II formado por Tabasco; GOM y Acapulco y Grupo III integrado por Yucatán Cocula, Progreso, OLEA, Jerbo, NINOA, CID, Morelos, CH30, Cc y Hy. Al incluir las cepas Sudamericanas, estas se enlazan a los aislados CID y Morelos formando un grupo sensiblemente diferente entre los aislados del grupo I (Fig. 10).

El dendrograma muestra variabilidad entre y dentro de los grupos y no se observó una relación entre la localidad y origen del aislado. Estos resultados muestran que la composición protéica puede ser producto de la estructura clonal

---

---

de la población de *Trypanosoma cruzi* en donde cada aislado ha evolucionado de forma independiente.

Tibayrenc y Ayala (1988) al estudiar los zimogramas de 524 aislados de *T. cruzi* provenientes de diversos países de América Latina y de una variedad de huéspedes vertebrados e invertebrados, observó elevada variabilidad genética que apoya la estructura clonal por linajes de *T. cruzi* <sup>47</sup>. En 1990, Tybayrenc reporta desviación del equilibrio Hardy-Weinberg lo que sustenta aún más la existencia de una estructura clonal en la población del parásito <sup>21</sup> y Andrade en 1999 expresa que *T. cruzi* es una población multiclonal compleja que difiere tanto en sus características genéticas como biológicas, sugiriendo que cada cepa o aislado de *Trypanosoma cruzi* representa una subespecie con base a sus características intrínsecas y en su composición antigénica<sup>48</sup>.

*Tinción para glicoproteínas.* Al comparar los perfiles electroforéticos de las cepas Sudamericanas entre sí (Fig. 12c), se identificó un índice de similitud de 0.33. Los aislados mexicanos mostraron índices que van de 0.11 a 0.38 con respecto a la cepa Chilena (Fig 12a) y de 0.09 a 0.42 referente a la cepa Brasileña (Fig 12b). Considerando un coeficiente de variación del 5% para clasificar los índices como iguales o diferentes a las cepas de referencia, se detecta la presencia de 3 grupos: en el primero hay 4 aislados con índices de similitud iguales (Cocula, MIGUZ, Morelos y Tabasco) para las dos cepas Sudamericanas, en el segundo existen 7 aislados (CH30, Yucatán, OLEA, Progreso, NINOA, Zacatecas Y GOM) que presentaron una similitud mayor con Brasil y un tercero con los 6 restantes (Jerbo, Hy, Petaquillas, Cc, CID y Acapulco) que expresan una similitud mayor con Chile (Gráfica3). En cuanto a su localidad y origen, no se observó una asociación. Los aislados mexicanos comparados con el perfil electroforético más rico (Progreso) reveló coeficientes de similitud de 0.19 a 0.38, estos datos muestran que aún entre los aislados mexicanos hay diferencias importantes en los perfiles de glicoproteínas (Gráfica 4). Nuestros resultados muestran la presencia de diversos perfiles glicoprotéicos

---

---

en los aislados estudiados lo cual puede ser consecuencia directa de la estructura clonal y composición genética del parásito.

Al investigar la existencia de una estructura jerárquica de los datos de acuerdo a su semejanza o diferencia utilizando la métrica de porcentaje de desacuerdo normalizado y el enlace de mínima varianza de Ward, se formaron dos grupos definidos al considerar un 50% de similaridad. Grupo I: constituido por los aislados de Progreso, Morelos, OLEA, Yucatán, Tabasco, GOM, Hy, Cc, Jerbo, CID y CH30, y Grupo II formado por Acapulco, Cocula, Zacatecas, Petaquillas, NINOA y MIGUZ. Al incluir las cepas sudamericanas estas se enlazan con los aislados CID, Jerbo y CH30 formando un grupo sensiblemente diferente dentro del grupo I (Fig. 13). Al investigar la relación de los grupos formados y su localidad se observó una ligera tendencia, sin embargo esta observación debe ser tomada con precaución ya que el número de aislados es reducido. No existe una relación entre grupos y el origen aislado. El dendrograma revela que aún dentro de cada grupo hay variabilidad en los perfiles electroforéticos para las glicoproteínas, sin embargo se observa una disminución en la variabilidad global, pues sólo hay dos grupos.

Bucio y col. (1999) reportan variación en el contenido de proteínas y carbohidratos en extractos de tres cepas mexicanas (Tequesquitengo, Querétaro y Yucatán)<sup>49</sup>, estos hallazgos son consistentes con Araujo y col. (1981) en otras variedades de *Trypanosomas*<sup>50</sup>. Almeida y col. (1999) demuestran que en *T. cruzi* existe una variedad de glicoconjugados en su superficie, los más abundantes son las glicoproteínas parecidas a la mucina<sup>51</sup>. Esto fue observado primero por Alves y Colli (1975) durante un proceso de purificación de glicoproteínas de epimastigote por cromatografía en gel. Estas diferencias en glicoproteínas influyen en la inmunodominancia de los antígenos<sup>52</sup>, como fue demostrados por Miles y col (1984) al caracterizar un anticuerpo monoclonal que reconoce una glicoproteína de 72 kDa que diferencia entre aislados con zimodema I y 2.<sup>53</sup>

---

---

*Tinción para sialolipoproteínas-lípidos.* Al comparar los perfiles electroforéticos de las cepas Sudamericanas se calculó un índice de similitud de 0.17 (Fig 15c), los aislados mexicanos mostraron índices de 0.05 a 0.33 con respecto a la cepa Chilena (Fig. 15a) y de 0.06 a 0.34 a la Brasileña (Fig. 15b), hay 6 aislados (CH30, Yucatán, Morelos, Cc, NINOA y Acapulco) que presentaron mayor semejanza con Brasil, 7 aislados (MIGUZ, Cocula, Petaquillas, Jerbo, OLEA, CID y Tabasco) con una similitud mayor a la referencia Chilena, 3 aislados (Hy, Zacatecas y GOM) presentan igualdad en su índice de similitud con las cepas Sudamericanas y el aislado Progreso es totalmente diferente en su perfil para sialolipoproteínas-lípidos con respecto a las cepas Sudamericanas (Gráfica 5).

La similitud de los patrones electroforéticos de los aislados mexicanos comparados con el perfil electroforético más rico (Jerbo), como referencia, señaló coeficientes de similitud de 0.12 a 0.39, sugiriendo que aún entre los aislados estudiados hay diferentes patrones de sialolipoproteínas-lípidos (Gráfica 6). No se observó un patrón que sugiera asociación de los aislados mexicanos con su localidad y origen.

Al investigar la estructura jerárquica de los datos utilizamos la métrica de porcentaje de desacuerdo normalizado y el enlace de mínima varianza de Ward, se formaron dos grupos a una distancia de 50% de similaridad. Grupo I: constituido por los aislados de Cocula, Jerbo, OLEA, Cc y CH30, y el Grupo II formado por Petaquillas, Zacatecas, MIGUZ, NINOA, Morelos, Progreso, Tabasco, Acapulco, GOM, Yucatán y CID. Al incluir las cepas sudamericanas estas se agrupan con CID y Yucatán formando un grupo sensiblemente diferente dentro de los aislados mexicanos del Grupo II, (Fig. 16). Al buscar relación de los grupos formados y el origen de los aislados, no se presentó patrón alguno. El dendrograma demuestra que aún dentro de cada grupo hay variabilidad en los perfiles de sialolipoproteínas-lípidos en los extractos estudiados y al igual que en los perfiles de glicoproteínas, hay disminución en la

---

---

variabilidad global. La técnica de doble tinción Azul de Coomassie-Plata propuesta por Dzandu J. y Col. (1984) permitió detectar y visualizar directamente proteínas, sialolipoproteínas y lípidos <sup>54</sup>. Los geles teñidos con esta técnica mostraron que las bandas teñidas con los colores azul y amarillo presentan una mutua y exclusiva manera de expresión, siendo el color amarillo la evidencia para sialolipoproteínas-lípidos. Esta técnica es una herramienta para analizar la composición de los perfiles electroforéticos y probablemente facilite la interpretación de técnicas electroforéticas en dos dimensiones permitiendo la diferenciación y detección de proteínas, sialolipoproteínas y lípidos de importancia para desarrollar una técnica diagnóstica.

En general, los perfiles electroforéticos de proteínas, glicoproteínas, sialolipoproteínas-lípidos son significativamente variables en los aislados estudiados, esta variabilidad debe ser considerada como un factor importante al diseñar reactivos diagnósticos ya que esta forma parte del entorno epidemiológico. Momen (2001) señala que *Trypanosoma cruzi* es una especie politépica y manifiesta cierta dificultad al tratar de correlacionar cepas con la enfermedad del paciente, por otro lado manifiesta la urgencia de realizar estudios sistemáticos que determinen la variabilidad genética ya que las evidencias en estudios moleculares indican que al menos la mitad de la diversidad presente en los tripanosomátidos corresponde al género *Trypanosoma* <sup>55</sup>.

---

## 9. Conclusión.

- 1) El estudio fenotípico de los perfiles electroforéticos para proteínas, glicoproteínas, sialolipoproteínas-lípidos de 17 aislados mexicanos de *Trypanosoma cruzi* mostraron un alto grado de heterogeneidad lo cual es consistente con las evidencias de que este parásito tiene una estructura clonal en su población y que éstos han evolucionado en espacio y tiempo de forma independiente. Estos resultados apoyan la hipótesis de trabajo.
  - 2) Para proteínas encontramos tres grupos principales, para glicoproteínas solo dos y para sialolipoproteínas y lípidos también dos. En los tres casos, las cepas sudamericanas forman un grupo sensiblemente diferente del resto de los aislados mexicanos, estos hallazgos sustentan que la composición antigénica para generar un reactivo diagnóstico a partir de epimastigotes de *Trypanosoma cruzi* esta fuertemente influida por la estructura clonal de la población del parásito.
  - 3) La diversidad en la expresión de proteínas, glicoproteínas, sialolipoproteína-lípidos en los aislados mexicanos podría modificar las bondades diagnósticas de una técnica si en su diseño no se considera la variabilidad como parte del entorno epidemiológico y más aún cuando las técnicas diagnósticas se utilicen en algún escenario totalmente diferente.
-

---

## 10. Referencias.

1. Sahagún B. Fray. Historia general de las cosas de la nueva España. Editorial Porrúa. 1956, México, p.45.
  2. Hoffman C. Nota acerca de un probable transmisor de la tripanosomiasis humana en el estado de Veracruz. Rev Mex Biol. 1928; 8: 12-18.
  3. Mazzotti L. Investigación sobre la existencia de la enfermedad de Chagas en el país. Demostración de tripanosomas en los reduvidos transmisores. Rev Mex Biol. 1936; 16: 584-585.
  4. Mazzotti L. Infección natural de *T. cruzi* en *Triatoma dimidiata* de los estados de Yucatán, Campeche, Chiapas, Veracruz y Jalisco. Rev Mex Biol. 1937; 17: 283-286.
  5. Mazzotti L. Infección natural de *T. cruzi* en *Triatoma phyllosoma* y *T. pallidipenis* de la costa del pacífico de México. Rev Mex Biol. 1937; 18: 161-166.
  6. Mazzotti L. Variations in virulence for mice and guinea pigs in strains of *T. cruzi* from different species of bugs. Am J Hyg. 1940; 31: 67-85.
  7. Mazzotti L. Dos casos de la enfermedad de Chagas en el estado de Oaxaca, México. Gac Med Méx, 1940; 70: 417-420.
  8. Mazzotti L. Días E. Resumen de los datos publicados sobre la enfermedad de Chagas en México. Rev Soc Mex Hist Nat, 1949; 10: 103-111.
  9. Días E. Doenea de Chagas nas America II. Rev Bras Malariol. 1951; 3: 555-570.
  10. Tay J. Salazar P.M. Jiménez J. Ontiveros A. Epidemiología de la enfermedad de Chagas en la población de Oaxaca, México. Bol Sanit Panam. 1979; 87: 1-17.
  11. Tay J. Lara R. Velazco O. Gutiérrez M. Parasitología Médica. 5ª Ed México. Méndez Cervantes, 1991 : 112-122.
  12. Brener Z. General review on *Trypanosoma cruzi* classification and taxonomy. Rev Soc Bras Med Trop. 1985; 18: 1-8.
  13. Zavala J. Guzmán E. Acosta K. Rosado M. Importancia de la caracterización de cepas de *Trypanosoma cruzi*. Rev Biom. 1999; 10: 177-184.
-



14. Andrade S.G. Morphological and behavioral characterization of *Trypanosoma cruzi* strains. Rev Soc Bras Med Trop. 1985; 18: 39-46.
15. Brener Z. Life cycle of *Trypanosoma cruzi*. Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 1971; 12: 171-178.
16. Velasco C.O. Ibáñez B. S. Guzmán B. C. Enfermedades tropicales en México. Diagnóstico tratamiento y distribución geográfica. InDRE, SSA. México, 1994, 271-292.
17. Miles M. A. Toye P. J. Oswald S.C. and Godfrey. The identification by isoenzyme patterns of two distinct strain-groups of *Trypanosoma cruzi* circulating independently in a rural area of Brazil. R Soc Trop Med Hyg. 1977; 71: 217-225.
18. Miles M.A. Lanham S. M. Almeida A. and Povoá M. Further enzymic characters of *Trypanosoma cruzi* and their evaluation for strain identification. R Soc Trop Med Hyg. 1980; 71: 217-225.
19. Tibayrenc M. Ayala F.J. Ward P. Natural populations of *Trypanosoma cruzi*, the agent of Chagas disease, have a complex multiclonal structure. Proc Natl Acad Sci USA. 1986; 83: 115-119.
20. Tibayrenc M. Kjellberg F. Arnaud J. Oury B. Breniere S. Dardé M.L. and Ayala J.F. Are eukaryotic microorganisms clonal or sexual? A population genetics viewpoint. Proc Natl Acad Sci USA. 1991; 88: 5129-5133
21. Tibayrenc M. Kjellberg F. Ayala J.F. A clonal theory of parasitic protozoa: the population structures of *Entamoeba*, *Giardia*, *Leishmania*, *Naegleria*, *Plasmodium*, *Trichomonas* and *Trypanosoma* and their medical and taxonomical consequences. Proc Natl Acad Sci USA. 1990; 87: 2414-2418.
22. Blanco A. Montamat E. Genetic variation among *Trypanosoma cruzi* populations. J Exp Zool. 1998; 70, 282: 62-70.
23. Tibayrenc M. and Ayala J.F. Forte correlation entre classification isoenzymatique et variabilité de l'ADN kinetoplastique chez *Trypanosoma cruzi*. C. R. Acad Sci (III). 1987;304:89-92
24. Zavala-Castro J.E. Velasco-Castrejón O. Hernández R. Molecular characterization of Mexican stocks of *Trypanosoma cruzi* using total DNA. Am J Trop Med Hyg. 1991; 47: 201-209.

- 
25. López-Olmos V. Pérez-Nasser N. Piñero D. Ortega E. Hernandez R. Espinosa B. Biological characterization and genetic diversity of Mexican isolates of *Trypanosoma cruzi*. Acta Tropica.1998; 69: 239-254.
  26. Espinosa B. Bosseno F. Sanchez B. Breniere F. Analysis of minicircle kDNA homologies by Croo-hybridization. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2000; Vol. 95: 473-476.
  27. Goldsmith R. Heynemen O. Tripanosomiasis Americana. Parasitología y medicina tropical. El Manual Moderno, México, 1996, pp. 346-359.
  28. Velasco C. La enfermedad de Chagas en México. Infectol .1992 ; 12: 783-791.
  29. Goldsmith R. Zarate R.J. Estudios clínicos y epidemiológicos de la enfermedad de Chagas en Oaxaca. Bol Sanit Panam. 1986; 100: 145-166.
  30. News Letters. Special Programme of Research and Traming in Tropical Diseases. WHO. 1982; No 18.
  31. Velasco C. O. Guzmán B. C. González D. La enfermedad de Chagas con especial referencia a México. Pub Tec INDRE. México 1991. No 8.
  32. Velasco C. O. Guzmán B. C. Valdespino G. Salvatierra B. Seroepidemiología de la enfermedad de Chagas en México. Rev Sai Pub. (Mex). 1992; 34: 186-196.
  33. Guzmán-Bracho C. Epidemilogy of Chagas disease in Mexico: an update TRENDS in parasitology 2001; 17: 372-376.
  34. Monteón P. V. Hernández B.N. Guzmán B. C. American Tripanosomiasis (Chagas disease ) and blood banking in México City : seroprevalence and its potential transfusional risk. Archives of Medical research. 1999; 30: 393-398.
  35. L. Zhang L. Tarleton R.L. Parasite persistence correlates with disease severity and localization in chronic Chagas disease. J I D. 1999; Vol. 180: 480-486.
  36. Espinosa B. Vera-Cruz J. M. Genotype and virulence correlation within Mexican stocks of *Trypanosoma cruzi* isolated from patients. Acta tropica. 1998.
  37. Gazzinell R. Talvani A. Camargo M. Santiago H. Induction of cell-mediated immunity during early stages of infection with intracellular protozoa. Braz J Med Biol Res. 1998; 31: 89-104.
  38. Tafuri W. L. Immunopathology of Chagas disease-A historical overview. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1999; Vol. 94: 247-248.
  39. Regueiro J. R. López L. C. Inmunología biología y patología del sistema inmune. 2ª Ed. Editorial Médica Panamericana. España, 1997. pp. 111-121.
-

- 
40. Setu E.U. Silveira J. F. Serological diagnosis of Chagas disease with purified and defined *T. cruzi* antigens, Mem Inst Oswaldo Cruz. 1999; Vol. 94: 285-288.
  41. Schenone H. Xenodiagnosis. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1999; Vol 94: 289-294.
  42. Oelemann W. M. R. Teixeira M.G.M. Peralta J.M. Screening and confirmation in Chagas disease serology a contribution. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1999; Vol. 94: 307-308.
  43. Umezawa E. S. Bastos S.F. Camargo M.E. Yamauchi L.M. Evaluation of recombinant antigens for serodiagnosis of Chagas disease in South and Central America. J Clin Microbiol 1999; Vol. 37: 1554-1560.
  44. Chiari E. Chagas disease diagnosis using Polimerase Chain Reaction, Hemoculture and serologic methods, Mem Inst Oswaldo Cruz. 1999; Vol. 94: 299-300.
  45. Norma Oficial Mexicana. Para la vigilancia epidemiológica. Prevención y control de enfermedades transmitidas por vector. (Diario oficial. PROY-NOM-032-SSA-2000). pp 1-45, 8 January 2001.
  46. Zingales B. Stolf S. Souto P. Fernandez O. Briones R. S. Epidemiology, biochemistry and evolution of *Trypanosoma cruzi* lineages based on ribosomal RNA sequences. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1999; Vol. 94: 159-164.
  47. Tibayrenc M. Ayala J. Isozyme variability in *Trypanosoma cruzi*, the agent of disease: genetical, taxonomical and epidemiological significance. Evolution. 1988; 42, 2: 277-292.
  48. Andrade S. *Trypanosoma cruzi* : clonal structure of parasite strains and the importance of principal clones. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1999; Vol. 94: 185-187.
  49. Bucio I. M. Cabrera M. Segura L. Zenteno E. Salazar S. Identification of immunodominant antigens in mexican strans of *Trypanosoma cruzi*. Immunological investigation. 1999, 28; (4): 257-268.
  50. Araujo FG. Zingales B. Characterization of stages and strains of *Trypanosoma cruzi* by analysis of cell membrane components. J Immunol. 1981; 127: 855.
  51. Almeida C. Gazzinelli R. Ferguson M. Travassos R. *Trypanosoma cruzi* Mucins: Potential functions of a complex structure. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1999; Vol. 94: 173-176.
  52. Alves M. J. Colli W. Glycoproteins from *Trypanosoma cruzi* : partial purification by gel chromatography. FEBS. 1975; 52: 188-190.
-

53. Chapman M. D. Snary D. Miles A. Quantitative differences in the expression of a 72,000 molecular weight cell surface glycoprotein (GP72) in *Trypanosoma cruzi* zymodemes. J Immunol. 1984; 132:3149-3153.
54. Dzandu K. J. Deh E. M. Denise L. Barratt and Wise E. G. Detection of erythrocyte membrane proteins, sialoglycoproteins and lipids in the same polyacrylamide gel using a double-staining technique. Proc Natl Acad Sci. USA. 1984; Vol 81: 1773-1737.
55. Momen H. Some current problems in the systematics of Trypanosomatids. Int J Parasitol. 2001; 31: 640-642.
-

## 11. Anexos.

Preparación de reactivos y soluciones:

1. Masa húmeda de parásito. Epimastigotes de *Trypanosoma cruzi* en fase logarítmica de crecimiento se cosecharon por centrifugación y se lavaron 2 veces con solución salina estéril. Se determinó el peso de la masa húmeda al resta el peso del tubo.

2. TBS, Tris base salina 100 mM, NaCl 0.15M. A 1.21g de Tris base (tris-hidroximetil-amino-metano) se agregaron a 80 mL de agua bidestilada, se ajustó el pH a 7.5 con HCl fumante al 37%, se agregó 0.88g de NaCl y se aforó a 1000 mL.

3. Tioglicolato de sodio 1 :20.000. A 10 mg de tioglicolato de sodio se agregaron 10 mL de TBS ( concentración final 1 : 1000), de esta solución se tomó 1 mL y se llevó a 20 mL con TBS.

4 Inhibidores de proteasas:

- EDTA 1M pH 8. A 10 mL de agua destilada se agregó 2.92g de EDTA y se almacenó a -20°C en fracciones de 1 mL.

- PMSF (Fluoruro de fenilmetilsulfonilo) 0.333M. A 10 mL etanol grado reactivo se agregó 581 mg de PMSF y se almacenó a -20°C en fracciones de 1 mL.

- Aprotinina 1mM. A 10 mL de agua destilada se agregó 6.5 mg de aprotinina.

Solución de trabajo

- PI-A 200x. 1 mL de EDTA 1M pH 8.0 se llevó a un volumen de 5 mL con agua destilada, se almacenó a -20°C en fracciones de 1 mL.

- PI-B, 200x. A 2 mL de etanol grado reactivo se agregó 3 mL de PMSF 0.333M (si es necesario calentar en baño de agua a 65°C para su disolución), se fraccionó y almacenó a -20°C.

- Aprotinina. A 3 mL de aprotinina 1 mM se agregó 2 mL de agua destilada, se fraccionó y almacenó a -20°C.

5. Soluciones método de Lowry .

- Solución A: (Mezcla de A1, A2 y A3)

A1: Tartrato de sodio ( $\text{Na}_2\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) 2 g, se aforó a 100 mL.

A2: Sulfato de cobre ( $\text{CuSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ) 1 g, se aforó a 100 mL con  $\text{H}_2\text{O-d}$ .

A3: Carbonato de sodio ( $\text{NaCO}_3$ ) 20 g, se aforó a 1000 mL con NaOH 0.1N.

Mezcla de trabajo, solución A

A1: 0.5 mL  
A2: 0.5 mL  
A3: 50 mL

- Solución B: Reactivo de Folin (Fenol-Ciocalteu) 1N. Se diluyó volumen a volumen con agua destilada.

6. **Electroforesis PAGE-SDS 11%, Glicerol 10%.**

- Solución acrilamida bis-acrilamida (30.0% T 0.8% C bis).

Acrilamida	30.0 g
Bis-acrilamida	0.8
Agua destilada	100 mL

Preparación: en aproximadamente 80 mL disolver y aforar a 100 mL, filtrar por papel Whatman No 1 y conservar a 4 °C en frasco ámbar.

- Solución de monómeros para el gel concentrador:

Solución acrilamida bis-acrilamida	5.5 mL
4x TRIS 1.5 M pH 8.8+SDS	3.75 mL
Agua bidestilada	4.75 mL
Glicerol 10% v/v	1.5 mL
Persulfato de amonio al 10%	0.05 mL
TEMED	0.01 mL

NOTA: Cantidad suficiente para preparar 2 minigeles de 7x10 cm.

- Solución de monómeros para el gel separador.

Solución acrilamida bis-acrilamida	0.65 mL
4x TRIS 0.5 M pH 6.8+SDS	1.25 mL
Agua bidestilada	2.1 mL
Glicerol 10% v/v	0.9 mL
Persulfato de amonio al 10%	0.05 mL
TEMED	0.01 mL

- Solución reguladora 4x Tris 1.5 M, pH 8.8 + SDS, gel separador.

Tris-base	18.5 g
-----------	--------

Preparación: Disolver en aproximadamente 80 mL y ajustar pH con ácido clorhídrico concentrado, agregar 0.4g de SDS, aforar a 100 mL, filtrar por papel Whatman No 1 y conservar a 4 °C en frasco ámbar.

- Solución reguladora 4x Tris 0.5 M, pH 6.8 + SDS para gel concentrador

Tris-base	6.05 g
-----------	--------

Preparación: Disolver en aproximadamente 80 mL y ajustar pH con ácido clorhídrico concentrado, agregar 0.4g de SDS, aforar a 100 mL, filtrar por papel Whatman No 1 y conservar a 4 °C en frasco ámbar.

- Persulfato de amonio (PA) al 10%
 

PA	100 mg
Agua destilada	1.0 mL

Nota: Se recomienda sólo preparar la cantidad suficiente a utilizar, pues el reactivo es inestable.

- TEMED (N,N,N',N'-tetrametil etilén diamina)  
Agregar de 10 µL por gel.
- Azul de bromofenol (0.5% w/v en etanol al 10%)
 

Azul de bromofenol	50 mg
Etanol al 10%	10 mL
- Solución reguladora de corrimiento 5x
 

Glicina	72 g
Tris-base	15 g
SDS	5g
Agua destilada	1 L

Preparación: Diluir 200 mL a 1 L, no es necesario medir el pH (aproximado a 8.3), se almacena en refrigeración.

- Solución Reguladora de muestra 2x:
 

4x Tris 0.5 M, pH 6.8 + SDS	2.5 mL
SDS	0.4
Glicerol	2.0 mL
β-mercaptoetanol	0.2 mL
Agua destilada	4.7 mL
Azul de bromofenol 0.05%	0.2 mL

Preparación: Mezclar un volumen de muestra problema con un volumen de regulador de muestra 2x. Se recomienda fraccionar en volúmenes de 1 mL y congelar a -20 °C hasta su uso.

#### 7. Tinción azul de Coomassie:

- Solución madre azul de Coomassie:
 

Azul de Coomassie R-250	2 g
Agua destilada	200 mL

Preparación: Disolver en agua caliente, filtrar en papel Wathman No.1 y conservar en frasco ámbar a temperatura ambiente.

- Solución de trabajo azul de Coomassie:

Solución madre azul de Coomassie	31.3 mL
Metanol	125 mL
Ácido acético glacial	25 mL
Agua destilada	68.7 mL

Preparación: mezclar y llevar a 250 mL, filtrar por papel Whatman No.1 y conservar en frasco ámbar a temperatura ambiente.

- Solución decolorante de gel teñido con azul de Coomassie:

Metanol	500 mL
Ácido acético glacial	100 mL
Agua destilada	400 mL

#### 8. Tinción carbohidratos: Oxidación p-fenilendiamina

Solución A:	Ácido peryódico	1.0 g
	Acetato de sodio trihidratado	2.7g
	Etol 5% v/v	100 mL
Solución B:	$\alpha$ -naftol	144 mg
	Agua destilada	100 mL
Solución C:	p-fenilendiamina	108 mg
	Agua destilada	100 mL
Solución D:	Peróxido de hidrógeno al 10% v/v	