



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

"CARACTERIZACION BIOLOGICA E
INMUNOQUIMICA DE CUATRO AISLADOS DE
Trypanosoma cruzi"

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

B I O L O G O

P R E S E N T A ;

JOSE HUGO AGUILAR DIAZ



FACULTAD DE CIENCIAS
UNAM

DIRECTORA DE TESIS: BIOL. YOLANDA GUEVARA GOMEZ

2004



FACULTAD DE CIENCIAS
SECCION ESCOLAR



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.

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: JOSE HUGO AGUILAR DIAZ

FECHA: 2-AGO-04

FIRMA: [Firma]

ACT. MAURICIO AGUILAR GONZÁLEZ
Jefe de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo escrito:

"Caracterización biológica e inmunoquímica de cuatro aislados de *Trypanosoma cruzi*"

realizado por José Hugo Aguilar Díaz

con número de cuenta 9419788-8 , quien cubrió los créditos de la carrera de: **Biología**

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis
Propietario

Biól. Yolanda Guevara Gómez

[Firma]

Propietario

Dra. Paz María Salazar Schettino

[Firma]

Propietario

M. en C. Martha Irene Bucio Torres

[Firma]

Suplente

M.C. Adela Luisa Ruíz Hernández

[Firma]

Suplente

M. en C. Rogelio Rosas Valdez

Rogelio Rosas V.

Consejo Departamental de Biología

M. en C. [Firma] Juan Manuel Rodríguez Chávez

FACULTAD DE CIENCIAS



UNIDAD DE ENSEÑANZA DE BIOLOGÍA

**Este trabajo se realizó en el laboratorio de Biología de Parásitos de la
Facultad de Medicina de la UNAM con el apoyo económico de la Dirección
General de Asuntos del Personal Académico
(DGAPA), Proyecto IN238002.**

Dedicatoria

Con respeto y admiración a mi Padre José Aguilar Licea, por todo su amor, confianza, cariño y por haberme guiado a través del difícil camino de la vida y a mi Madre Ma. Dolores Díaz Bautista (mamita), por haberme dado la vida, por brindarme todo tu amor, por tus consejos y por enseñarme a ser el mejor en todo lo que hago, para ambos, esta tesis pertenece a ustedes, los amo gracias por todo.

A mi familia Isabel y Mayra, gracias por confiar en mi, por toda la felicidad y por estar siempre a mi lado en las buenas y en las malas, las adoro hermanitas.

A la familia Vera Aguilar, Palma por todos tus consejos, tu cariño y amor, gracias por cuidarme, Ángel por tu apoyo y confianza y a mis dos preciosas nenas que son la chispa de nuestra familia Marijose y Tonanzin los quiero.

A mi primo Rober, por todo tu apoyo, compañía y por todas las vivencias que pasamos juntos, gracias Brother.

A Diana, por tu apoyo, paciencia, cariño, por estar a mi lado en todo momento, sobre todo por tu amor y por todos estos años de felicidad, te amo, gracias por ser mi compañera.

A mi Tía Tere por todo el apoyo que nos ha brindado a largo de la vida y mi hermano menor Beto por todo lo que hemos pasado juntos.

A los del Club Enrique (Piolo), Francisco (Engendro), Arturo (Enano), Lalo (Gorda) y Julián gracias por brindarme su amistad, confianza, por creer en mi y estar conmigo siempre, los quiero, Up the Irons!!!!.

A los de la Fac., Fer, Chela, Hippie, Luis (gordito), Denisa, Mau, Norm, Chino y en la distancia la Kika, gracias amigos por todo este tiempo, por la confianza, sus enseñanzas y todo su apoyo, los quiero. A Jorge Ordoñez por su apoyo y su amistad gracias.

A los del Lab. Santi, Nelia, Laura, Citlalli, Vicente y Mauro, gracias por su apoyo, su amistad y por todo el tiempo compartido con Uds., son de lo mejor. A Lore por todos sus consejos, tu apoyo incondicional y sobre todo tu amistad, gracias amiga. A Evita y Chabe por su gran cariño, amistad y por su paciencia gracias.

A Yola por haberme guiado durante mi formación, por tu apoyo, confianza y por que haz sido una excelente amiga a lo largo de todo este tiempo gracias.

Y a todos aquellos son parte importante en mi vida y de este trabajo, los llevo en mi corazón, a todos mil gracias!!!!

Agradecimientos

A la Biol. Yolanda Guevara por su excelente dirección para el desarrollo de este trabajo.

A la Dr. Paz María Salazar por haberme brindado la oportunidad de formar parte de su equipo y por permitirme realizar este proyecto en el laboratorio.

A la M en C. Martha Bucio, por su apoyo para la realización de algunas pruebas y su orientación a lo largo del proyecto.

A la M. C. Adela Ruiz por la orientación y aportaciones para este proyecto.

A la Biol. Gloria Rojas y la M. En C. Margarita Cabrera, por todas las facilidades y apoyo brindado.

Al M en C. Rogelio Rosas por su apoyo y la orientación brindada.

A DGAPA por el apoyo económico para la elaboración de este trabajo.

A la UNAM la Máxima Casa de Estudio, por abrirme las puertas y permitirme ser parte de la comunidad universitaria.

A mis padres por todo su apoyo económico y moral gracias.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
2. GENERALIDADES	5
2.1 Antecedentes históricos.....	5
2.2 <i>Trypanosoma cruzi</i>	8
2.2.1 Ubicación taxonómica.....	8
2.2.2 Morfología.....	8
2.2.3 Ciclo de vida.....	11
2.2.4 Mecanismos de infección.....	13
2.2.5 Cuadro Clínico.....	14
2.2.6 Inmunología.....	15
2.2.7 Composición Bioquímica.....	16
2.2.8 Patogenia y Patología.....	16
2.2.9 Diagnóstico y tratamiento.....	18
2.3 Transmisor.....	19
2.3.1 Ubicación taxonómica.....	19
2.3.2 Características generales.....	19
2.3.3 Distribución geográfica.....	21
2.4 Reservorios.....	21
3. JUSTIFICACIÓN	23
4. HIPÓTESIS	24
5. OBJETIVOS	25
6. DISEÑO EXPERIMENTAL	26
7. METODOLOGÍA	27
7.1 Obtención de aislados de <i>Trypanosoma cruzi</i>	27
7.2 Siembra del parásito en medios de cultivo.....	27
7.2.1 Determinación de curvas de crecimiento.....	28
7.3 Infección en ratón blanco.....	28
7.3.1 Determinación de curvas de parasitemia.....	28
7.4 Obtención de antígenos parasitarios.....	29
7.4.1 Cosecha de parásitos.....	29
7.4.2 Extracción antigénica.....	29
7.4.3 Cuantificación de proteínas.....	30
7.4.4 Cuantificación de carbohidratos.....	30
7.4.5 Separación de componentes proteicos y determinación de pesos moleculares por electroforesis en poliacrilamida (SDS PAGE).....	30
7.4.6 Electroinmunotransferencia de componentes proteicos.....	31
8. RESULTADOS	32
8.1 Determinación de Curvas de Crecimiento y Parasitemia.....	32
8.2 Cuantificación de Proteínas y Carbohidratos.....	38
8.3 Separación de componentes proteicos y determinación de pesos moleculares por electroforesis en poliacrilamida.....	39
8.4 Electroinmunotransferencia de extractos antigénicos.....	40
9. DISCUSIÓN	41
10. CONCLUSIÓN	43
11. BIBLIOGRAFÍA	44

1. INTRODUCCIÓN

La Tripanosomiasis Americana o enfermedad de Chagas, es causada por *Trypanosoma cruzi*, protozooario hemoflagelado que pertenece a la familia Trypanosomatidae, incluido en el orden de los Kinetoplastida. Este parásito protozooario fue aislado por primera vez en Brasil por Carlos Chagas en el año de 1909, y es transmitido a huéspedes mamíferos incluyendo al hombre, por medio de insectos vectores de la familia Reduvidae^{1,2}.

Esta enfermedad se encuentra ampliamente distribuida en el continente Americano, desde el sur de los Estados Unidos hasta Chile, Argentina y algunos países de las Antillas. La Organización Mundial de la Salud (OMS) reporta que unos 100 millones de personas se encuentran expuestas a contraer la infección y el número de personas infectadas es de 16 a 18 millones³.

La diferencia en cuanto a la severidad de la enfermedad en el huésped humano y en otros mamíferos, se ha atribuido al pleomorfismo natural que presenta *T. cruzi*, el cual se demuestra al estudiar sus aspectos biológicos, bioquímicos y moleculares. Así se han encontrado grandes diferencias en el comportamiento de las cepas tanto *in vitro* como *in vivo* y se han descrito posibles implicaciones del vector en la modulación de la virulencia de las cepas⁴⁻⁶.

Esta variabilidad en su comportamiento biológico y la heterogeneidad que presenta el parásito en sus características bioquímicas y moleculares, han dificultado establecer parámetros adecuados para su estudio, lo que ha hecho que su caracterización sea una condición necesaria para su control⁷.

T. cruzi presenta poblaciones que circulan entre vectores y mamíferos reservorios, ya sean domésticos, peridomésticos o silvestres. El hombre, en este caso, desde el punto de vista estrictamente biológico funciona también como reservorio. Se han realizado aislamientos del parásito de diversos huéspedes, demostrándose

una gran variación intraespecífica en cuanto a morfología de las formas parasitarias, virulencia, patogenicidad, susceptibilidad para agentes quimioterapéuticos, constitución antigénica y capacidad de infección a células hospederas⁸.

El comportamiento del parásito puede estar influenciado por las condiciones tanto del huésped como del medio ambiente, razón por la cual se han realizado estudios para identificar la heterogeneidad a nivel bioquímico y molecular de las diferentes cepas del parásito, así como la variabilidad en su comportamiento biológico y su correlación clínico - epidemiológica⁹⁻¹¹.

Existen varios tipos de caracterización basados en criterios biológicos, inmunológicos y bioquímicos.

La caracterización biológica se basa en las diferencias existentes en el desarrollo del parásito en huéspedes mamíferos (curso de la infección) y en las variaciones en la sensibilidad a los agentes quimioterapéuticos. Además, la identificación de los aislados se realiza sobre la base de las características inmunológicas y biológicas. *T. cruzi* infecta gran variedad de huéspedes vertebrados; se han descrito más de 100 especies de mamíferos infectados natural o experimentalmente. En infecciones experimentales en ratones de laboratorio, las formas sanguíneas del parásito pueden presentar diferente morfología y han sido descritas formas delgadas, anchas y robustas que pueden presentar diferentes patrones de parasitemia. Algunos aislados, en las que se han definido firmemente sus características en cuanto a histotropismo, están siendo consideradas como prototipos de clasificación. Para este fin, también se han utilizado grados variables de virulencia, evaluada sobre los periodos prepatentes, curso de la parasitemia e índices de mortalidad. La caracterización inmunológica, para detectar las diferencias antigénicas existentes dentro de un complejo grupo de poblaciones de *T. cruzi* se han empleado una serie de métodos inmunológicos convencionales y también mas avanzados. Mediante estudios acerca de los componentes rotulados

de la superficie del parásito, se ha demostrado la existencia de antígenos específicos para ciertos aislados, además de las glucoproteínas que son comunes a todos. Existen reportes de caracterización y aislamiento de glucoproteínas y otros componentes de la membrana celular del parásito que se han utilizado para diferenciar entre las fases morfológicas y aislados de *T. cruzi*. Se han utilizado también anticuerpos monoclonales para la diferenciación de los aislados. Los antígenos codificados por genes clonados de *T. cruzi* son reconocidos específicamente por sueros de diferentes pacientes con enfermedad aguda o crónica, pero no se ha logrado aún tipificar los aislados de *T. cruzi* con base en las características antigénicas¹²⁻¹⁵. La caracterización bioquímica mediante la electroforesis en gel permite la detección entre aislados de enzimas que poseen actividad catalítica similar, pero que pueden diferir en otros aspectos (isoenzimas); esto ha permitido diferenciar grupos de aislados en zimodemos, es decir, en grupos con perfiles isoenzimáticos idénticos. Mediante el análisis de numerosas cepas aisladas de diferentes huéspedes y distintas zonas endémicas se ha logrado establecer la existencia de al menos tres zimodemos principales (Z1, Z2 y Z3). Existe también la caracterización de aislados por esquizodemos, basada en marcadores genotípicos que se realiza mediante el análisis de perfiles de electroforesis en geles con DNA del kinetoplasto (kDNA) producidos por enzimas (endonucleasas de restricción) que reconocen y discriminan entre secuencias específicas de nucleótidos de DNA. Los aislados muestran patrones similares de restricción de kDNA que posteriormente se agrupan en esquizodemos. Si bien, se han observado diferencias cualitativas y cuantitativas en los distintos aislados, debido a la gran heterogeneidad de los perfiles esquizodémicos, éstos no se pueden emplear como sistema de caracterización de *T. cruzi*¹².

T. cruzi es un grupo heterogéneo de parásitos, que al ser expuestos a diversas presiones naturales y artificiales, pueden originar por selección nuevos subgrupos que poseen diferentes características biológicas, bioquímicas, inmunológicas, parasitológicas e histopatológicas que pueden ser utilizadas como parámetros

para evaluar a cada grupo.¹⁶ Estos datos pueden ayudar a comprender la relación huésped-parásito, en la infección y durante el desarrollo de la enfermedad. La caracterización bioquímica y biológica de aislados ha sido poco estudiada y en México, con aislados de procedencia regional, existen aun menos¹⁷⁻¹⁹.

En el presente estudio se realiza la caracterización de cuatro cepas de *T. cruzi* procedentes de diferentes localidades y especies de triatomíneos; esto se hizo con base en las características biológicas e inmunoquímicas de los mismos.

2. GENERALIDADES

2.1 Antecedentes Históricos

Chagas 1909. Reporta por primera vez la Tripanosomiasis Americana, realiza el aislamiento del parásito a partir de las heces de los triatomíneos y lo describe también en reservorios no humanos¹.

Desde 1911 se ha reportado la existencia de cepas de *T. cruzi* con tropismo a diferentes órganos, lo que se ha relacionado con características fisiológicas de las formas sanguíneas de diversas cepas.

Hoffman 1928. Primer reporte del insecto triatómico (*Triatoma dimidiata*) en Veracruz, México²⁰.

Mazzotti 1936. Demuestra un elevado porcentaje de triatóminos naturalmente infectados en Tututepec, Oaxaca²¹.

Mazzotti 1940. Reporta los 2 primeros casos en humanos de la enfermedad de Chagas en México en Teojomulco, Oaxaca²².

Tay y cols. 1969. Evalúan el comportamiento en ratón blanco de una cepa de *T. cruzi* mediante pases sucesivos en diferentes especies de triatóminos²³.

Tay y cols. 1973. Presentan resultados obtenidos al estudiar el comportamiento de seis cepas mexicanas de *T. cruzi* aisladas de diferentes regiones de la República Mexicana, inoculadas en ratón blanco, determinando el grado de parasitemia que desarrollara después del aislamiento, relacionando el porcentaje de nidos de amastigotes en diferentes órganos con la virulencia de la cepa; y evalúan en otro trabajo el comportamiento de una cepa de *T. cruzi* mediante pases consecutivos en diferentes especies de triatóminos en ratón blanco^{24,25}.

Brener y cols. 1974. Evalúan el comportamiento de tres cepas de *T. cruzi* en ratón, mantenidas ocho años en el laboratorio, por pases consecutivos en sangre²⁶.

Salazar 1975. Evalúa el comportamiento de una cepa mexicana de *T. cruzi* aislada de *Triatoma phyllosoma mazzotti* en ratón blanco²⁷.

Segura 1977. Evalúa la eficacia de fracciones subcelulares de epimastigotes con fines inmunoprotectores y de diagnóstico y describe las características ultraestructurales y de actividad antigénica de las mismas^{28,29}.

Salazar 1978. Realiza un estudio comparativo de la patogenicidad de cuatro cepas de *T. cruzi* (tres aisladas de *Triatoma barberi* y una de humano) en el ratón blanco³⁰.

Romanha y cols. 1979. Evalúa los cambios a través del tiempo de un cultivo de *T. cruzi* de prolongado mantenimiento, mediante patrones isoenzimáticos³¹.

Araujo y cols. 1981. Realizan una caracterización de tripomastigotes, amastigotes y epimastigotes, de diferentes cepas de *T. cruzi* mediante el análisis de componentes membranales³².

Tybayrenc y Miles. 1983. Identifican mediante isoenzimas, varios zimodemos de *T. cruzi* con características biológicas y patológicas particulares³³.

Salazar y cols. 1984. Presentan el primer caso de megaesófago chagásico en la República Mexicana, diagnosticado por serología, sus antecedentes epidemiológicos, datos clínicos e histopatología³⁴.

Andrade y Magalliales 1997. en un estudio mediante la evaluación de las características biológicas como la virulencia, la evolución de la parasitemia, el

histotropismo y las formas celulares predominantes, hacen la diferenciación de hasta tres grandes grupos de cepas de *T. cruzi*, que denominan como biodemos³⁵.

López y cols. 1998. Realizan la caracterización biológica y evalúan la diversidad genética de 17 aislados de *T. cruzi* del centro y sureste de México, comparando los resultados obtenidos con cuatro cepas americanas y una clona de Brasil¹⁷.

Bucio y cols 1999. Identifican antígenos inmunodominantes a partir de epimastigotes, tripomastigotes y esferomastigotes, de cepas mexicanas de *T. cruzi*³⁶.

Zaidenberg y cols. 2000. Obtienen amastigotes extracelulares y evalúan su crecimiento en diferentes condiciones de cultivo³⁷.

Rivera y cols. 2000. Evalúan el comportamiento biológico de diferentes aislados de *T. cruzi*, en ratón blanco y mediante perfiles isoenzimáticos³⁸.

Barrera y cols. 2001. Evalúa el comportamiento biológico de tres aislados de *T. cruzi* obtenidos en Yucatán, México, de pacientes infectados con *T. cruzi*³⁹.

2.2 *Trypanosoma cruzi*.

2.2.1 Ubicación Taxonómica.

Ubicación taxonómica de *T. cruzi*¹.

Reino Protista

Subreino Protozoa

Phylum Sarcomastigophora

Subphylum Mastigophora

Clase Zoomastigophorea

Orden Kinetoplastida

Suborden Trypanosomatina

Familia Trypanosomatidae

Género *Trypanosoma*

Especie *Trypanosoma cruzi* (Chagas, 1909)

T. cruzi es un protozooario hemoflagelado, el cual se caracteriza por la presencia de un organelo denominado kinetoplasto, formado por una red fibrosa de ADN extranuclear localizada en la mitocondria¹.

2.2.2 Morfología

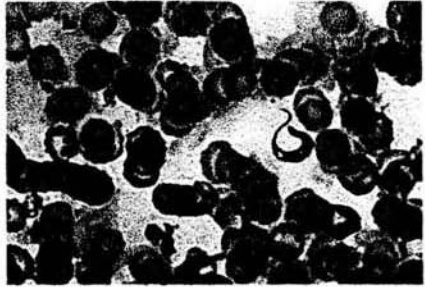
T. cruzi presenta principalmente cuatro estadios morfológicos: epimastigote, promastigote, tripomastigote y amastigote, los cuales se diferencian entre sí por la presencia o ausencia de la membrana ondulante y del flagelo, así como por la disposición del kinetoplasto en relación al núcleo⁴⁰.

El **epimastigote** se encuentra en el intestino medio del triatomino, donde se multiplica por fisión binaria longitudinal, y en medio de cultivo. Tiene aspecto fusiforme, mide de 16 a 20 μm de longitud y el kinetoplasto se localiza en porción anterior al núcleo de donde surge el flagelo formando una pequeña membrana ondulante^{41,42}.

El **promastigote** es una forma transicional que se puede encontrar en el aparato digestivo del transmisor o en medio de cultivo, en este último, pueden observarse agrupados formando rosetas unidos por su porción posterior o libres. Es de forma alargada en forma de huso y mide de 16 a 18 μm de largo, tiene el kinetoplasto y el núcleo en la parte anterior, de donde se desprende el flagelo sin formar membrana ondulante^{43,44}.

El **tripomastigote sanguíneo** es un estadio no replicativo y se encuentra en el torrente circulatorio del vertebrado, mientras que el **tripomastigote metacíclico** se localiza en la ampolla rectal y heces del transmisor, es la forma infectante del parásito, esta fase tampoco se multiplica. Posee una forma característica que se asemeja a una "S" o "C", mide de 18 a 21 μm de largo; el kinetoplasto se localiza posterior al núcleo, de donde se origina el flagelo que forma una membrana ondulante antes de salir por la parte anterior, el núcleo se sitúa en la parte media central del microorganismo^{42,43}.

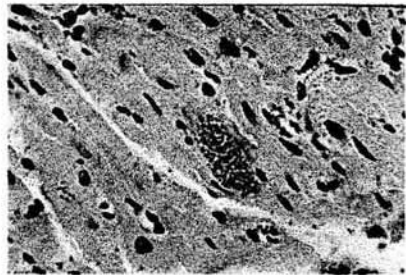
El **amastigote** constituye la forma tisular intracelular del parásito presente en el mamífero infectado, en el que se reproduce por fisión binaria longitudinal. Son estructuras esféricas que miden de 2 a 4 μm , el kinetoplasto tiene forma de bastoncillo, no posee flagelo libre y el núcleo es muy aparente⁴²⁻⁴⁴.(Fig. 1)



a) Tripomastigote sanguíneo



b) Epimastigotes en medio de cultivo formando agregados (rosetas)



c) Amastigotes en tejido cardíaco

Figura 1. Formas morfológicas de Trypanosoma cruzi. a) Tripomastigote; b) Epimastigote; c) Amastigote. (Tomado del Atlas de Parasitología CDC, Atlanta)

2.2.3 Ciclo de vida

En el ciclo de vida de *T. cruzi* están involucrados el hombre, el transmisor y gran variedad de mamíferos naturalmente infectados cuya importancia radica el papel que desempeñan como reservorios de este parásito en la naturaleza⁴⁵.

En condiciones naturales, el transmisor se alimenta de un mamífero infectado e ingiere junto con la sangre al parásito circulante, el cual se multiplica activamente por fisión binaria longitudinal en el intestino medio del insecto, y al cabo de 15 a 30 días en el intestino posterior del mismo se desarrollan los tripomastigotes metacíclicos, que son las formas infectantes. Cuando el insecto que alberga al parásito pica a un huésped sano, puede defecar sobre el, emitiendo deyecciones que albergan a las formas infectantes del parásito, que pueden penetrar por rascado en piel sana o escoriada, por la picadura o bien pueden ser llevadas hacia la conjuntiva del ojo, donde ocasionan una manifestación característica de la infección, llamada el signo de Romana⁴⁶⁻⁴⁹.

Dentro del mamífero, los tripomastigotes metacíclicos se introducen en las células del tejido linfoide transformándose en amastigotes, los cuales se multiplican por fisión binaria, hasta lisis la célula huésped para transformarse en tripomastigotes sanguíneos, diseminándose por el organismo a través del torrente circulatorio; estos penetran a nuevas células del tejido linfoide o muscular para iniciar nuevamente el ciclo, el cual se completa cuando los tripomastigotes son ingeridos por otro transmisor^{46,49}.(Fig. 2)

2.2.4 Mecanismos de infección

La infección en el humano puede ser adquirida por diversos mecanismos; el más frecuente se lleva a cabo en forma natural por medio del transmisor como se describió en el ciclo de vida, a este mecanismo actualmente ha sido definido como Chagas rural.

Otros mecanismos menos frecuentes pero con características que impactan a ciertos núcleos poblacionales, son los que se llevan a cabo en área urbanas y se relacionan con la transfusión sanguínea o sus componentes, y con transplante de órganos, principalmente renal y cardíaco denominado Chagas Urbano^{50,51}.

Otro mecanismo es la vía transplacentaria, neonatal y raramente ingestión de leche materna (a partir de la segunda mitad de la gestación)^{41,51,52}, denominado Chagas Connatal^{49,51}.

Otros mecanismos poco frecuentes son los accidentes de laboratorio^{49,53}, al igual que la ingestión de los artrópodos infectados, así como de carne insuficientemente cocida de reservorios y de alimentos o bebidas contaminadas con materia fecal de triatominos, así como orina y secreciones de las glándulas anales de marsupiales^{47,49,51,54,55}.

Un factor importante en la cadena epidemiológica y de la transmisión de la Enfermedad de Chagas es la migración poblacional rural-urbana, que hace posible que individuos infectados sean fuente de infección en áreas donde existe el vector y que al migrar trae como consecuencia que el parásito llegue a países donde la enfermedad no es endémica o no existe el vector; en estos casos la transmisión se realiza principalmente por transfusión sanguínea o vía transplacentaria^{51,56,57}.

El transporte de transmisores en el interior de equipajes de viajeros, enseres trasladados en mudanzas y materiales de viviendas procedentes de zonas de

intensa densidad de triatominos, han sido descritos también como factores para el ingreso del transmisor a zonas donde no existía anteriormente.⁵¹

2.2.5 Cuadro clínico

Después de la infección con *T. cruzi*, los síntomas aparecen posteriores a un periodo de incubación de 4 a 12 días. La historia natural de la enfermedad se caracteriza por presentar tres fases: fase aguda, latente o indeterminada y crónica.

Fase aguda. Se caracteriza por la presencia del parásito en sangre periférica y por manifestaciones muco-cutáneas ocasionadas por la entrada del parásito, así como manifestaciones sistémicas inespecíficas^{45,58}. Esta fase tiene una duración de dos a tres semanas, aunque se puede prolongar hasta dos meses.

Los signos mas frecuentes en esta fase, son generados después de la ingestión de sangre del artrópodo y la consecuente defecación y la entrada del parásito, en el sitio de la picadura presentandose el "chagoma de inoculación", que consiste en un nódulo subcutáneo, indoloro y el "signo de Romaña" (Fig 3) cuando la puerta de entrada es el área conjuntival y se genera un edema bpalpebral, unilateral, duro de color violáceo e indoloro, que desaparece en 2 a 4 semanas⁴⁶.

Esta fase de la enfermedad es generalmente asintomática, aunque el 36% de los pacientes presentan síntomas, las manifestaciones clínicas incluyen fiebre, anorexia, diarrea, inflamación de ganglios (adenomegalias), inflamación del hígado y bazo (hepato-esplenomegalia), la miocarditis en esta fase se presentan en niños en menos del 1% y rara vez en adultos⁵⁹. De los casos mas graves registrados en niños que se infectan durante los primeros año de vida, aproximadamente el 30% presenta datos clínicos después de 20 a 30 años de la primoinfección. La fase aguda la mayoría de las veces se resuelve espontáneamente en 4-8 semanas.



Fig. 3. Signo de Romaña
(Tomada del Atlas de Parasitología
CDC, Atlanta)

Fase indeterminada. De 8-10 semanas después de la fase aguda, la mayoría de los infectados evolucionan a esta fase, donde no hay manifestaciones clínicas y raramente se observan parásitos en sangre. La multiplicación del parásito es lenta y el diagnóstico se realiza principalmente mediante pruebas serológicas^{46,60,50}.

Fase crónica. Alrededor del 30% de los infectados pasan a esta fase y la mayoría de los casos presentan Miocardiopatía después de 10 a 20 años de la primoinfección; presentan alteraciones en el electrocardiograma (ECG) y clínicamente disnea, palpitaciones, dolor precordial, insuficiencia cardíaca, o incluso ocurrir muerte súbita por fibrilación ventricular⁶¹. Las complicaciones en las formas digestivas denominadas megas, representan el 6% de los casos e incluyen patología en colon, esófago, duodeno, estómago o vesícula y en menor proporción en uretero y vejiga entre otros⁴⁶.

En México al igual que en Argentina la forma más común de la enfermedad de Chagas crónica es la cardíaca, mientras que los megas lo son en ciertas regiones de Brasil y Chile⁶².

2.2.6 Inmunología

Desde el momento de la infección, la respuesta inmune protege al huésped contra los efectos de la invasión parasitaria y controla el número de parásitos en el organismo. A pesar de esta actividad protectora, *T. cruzi* no es erradicado totalmente ya que se ha visto que tiene la capacidad de evadir la respuesta inmune del huésped mediante varias estrategias, entre ellas: a) "capping", donde el parásito se mimetiza al expresar antígenos similares a los componentes del huésped b) localización intracelular, los amastigotes evaden los sistemas de inmunidad debido a su crecimiento y multiplicación dentro de la célula c)

destrucción intracelular, el parásito después de la invasión celular, impide la fusión de los lisosomas con el fagosoma y d) inmunosupresión, ha sido descrita la inducción de una inmunosupresión durante la fase aguda de la infección, con disminución de anticuerpos para ciertos antígenos (proteínas y carbohidratos)^{63,64}.

2.2.7 Composición Bioquímica

En cuanto al contenido de proteínas del parásito, la del epimastigote es del 43-53% referidos a peso seco. Los lípidos constituyen hasta un 20% del peso seco de los epimastigotes de cultivo y se han demostrado glicéridos esteroides, glucolípidos y fosfolípidos, siendo los ácidos no saturados los predominantes. *T. cruzi* metaboliza diversos carbohidratos, principalmente la glucosa; esta fermentación aeróbica produce CO₂ con liberación de acetato y succinato, entre otros. El ciclo de los ácidos tricarbónicos existe por lo menos en epimastigotes y en tripomastigotes.

Al igual que otros tripanosomatidos, *T. cruzi* carece de actividades de catalasa y de glutatión peroxidasa, enzimas directamente relacionadas en el metabolismo de radicales tóxicos. *T. cruzi* no es capaz de sintetizar ácido neuramínico, y lo incorpora a sus glucoconjugados del medio, utilizando la neuramidasa que expresa sobre su superficie celular^{44,65,66}.

2.2.8 Patogenia y Patología

Los mecanismos patogénicos por los cuales *T. cruzi* produce lesión, son muy variados y dependen de varios factores relacionados básicamente con el parásito y el huésped; en relación al parásito son el polimorfismo, tropismo, virulencia, constitución antigénica, cantidad de parásitos en el inóculo y atenuación de la virulencia. Referentes al huésped, están la constitución genética, sexo, edad, raza, especie, respuesta inmunológica, temperatura y estado nutricional, entre otros⁶⁷.

En estudios de laboratorio *in vivo* y en humanos se ha demostrado que aún cuando *T. cruzi* puede parasitar cualquier elemento del organismo, existen cepas con tropismos bien definidos hacia células, tejido u órganos⁶⁷.

En la histopatología existen dos lesiones fundamentales: la inflamatoria y el daño neuronal. En ambas, la respuesta del huésped a *T. cruzi* es consecuencia directa de la multiplicación del parásito, originando daño por destrucción de las células del huésped y por mecanismos de sensibilización; existen también alteraciones degenerativas en células no parasitadas inducidas por el proceso inflamatorio o por fenómenos de autoinmunidad.

Durante la **fase aguda** se presenta infiltrado inflamatorio a expensas principalmente de neutrófilos; al evolucionar el padecimiento, estos disminuyen y aumentan gradualmente los linfocitos, células plasmáticas y monocitos, para después, estos últimos transformarse en macrófagos que se fusionan para formar células gigantes multinucleadas.

En la **fase crónica**, al incrementarse la cantidad de macrófagos epitelioides y células gigantes forman cúmulos denominados propiamente granulomas⁴⁵.

A nivel neuronal, las lesiones se observan después de la ruptura de las células parasitadas, seguida por la desintegración de las formas parasitarias. La lesión neuronal consiste en un proceso degenerativo que finalmente terminará con la destrucción de la misma.

En la fase crónica de la enfermedad, las lesiones se caracterizan por la presencia de fibrosis además de la disminución en el número de neuronas, estas lesiones son irreversibles^{45,46}.

2.2.9 Diagnóstico y tratamiento

La presencia de las formas parasitarias y de anticuerpos anti-*T. cruzi* constituyen los elementos relevantes para el diagnóstico; por esta razón los métodos utilizados son parasitológicos e inmunológicos.

Los métodos parasitológicos sirven para demostrar la presencia del parásito en sangre y son de elección en la fase aguda de la enfermedad, donde la parasitemia es elevada y constante.

La observación microscópica de tripomastigotes en sangre puede realizarse por examen directo, gota gruesa o frote, lo cual diagnostica aproximadamente el 50% de los casos durante la fase aguda. Pueden emplearse también métodos de concentración como es el de Strout^{45,62,68}.

Otros métodos son el xenodiagnóstico, el Hemocultivo, la inoculación de animales de laboratorio y estudios histopatológicos⁶⁸.

Los métodos inmunológicos son útiles para demostrar la presencia de anticuerpos específicos generados por la infección, estos métodos son de elección principalmente en la fases crónica o indeterminada⁶⁸.

Existen numerosas técnicas para el reconocimiento de anticuerpos contra el parásito. Desde 1913, en que Guerreiro y Machado utilizan por primera vez un antígeno crudo para la reacción de fijación del complemento, han sido descritos numerosos métodos serológicos⁶¹.

En la actualidad, la OPS/OMS recomienda el uso de las pruebas de Hemaglutinación Indirecta (HAI), Inmunoensayo Enzimático (ELISA Indirecta) e Inmunofluorescencia Indirecta (IFI)⁶⁹.

Para el tratamiento específico, son dos los tripanocidas más usados: el Nifurtimox ("Lampit", Bayer) en dosis de 10 a 15 mg/kg peso corporal al día, y Benznidazol

("Radanil, "Rochagan" o "Ragonil", Roche) a razón de 5 a 7 mg/kg peso corporal día y se recomienda especialmente en casos agudos o de reciente infección y en neonatales⁶⁸. El tratamiento específico para las infecciones crónicas debe ser considerado de manera única en cada caso, lográndose disminuir la parasitemia y revertir el xenodiagnóstico positivo. En este tratamiento no existen reportes donde se refiera mejoría de la función cardíaca^{56,70}.

2.3 Transmisor

2.3.1 Ubicación taxonómica

El transmisor huésped intermediario de *T. cruzi*, es un artrópodo hematófago que posee la siguiente ubicación taxonómica (Borror 1992)

Reino Animalia

Phylum Artropoda

Subphylum Mandibulata

Clase Insecta (Hexapoda)

Orden Hemiptera

Familia Reduviidae

Subfamilia Triatominae

Géneros *Belminus*

Dipetalogaster

Eratyrus

Panstrongylus

Paratriatoma

Rhodnius

Triatoma

2.3.2 Características generales

Los triatominos son insectos cuyo cuerpo esta segmentado en cabeza tórax y abdomen, lo que le brinda una forma característica. Su tamaño es variable, ya que

va desde 5mm de largo de *Belminus costaricensis* (Lent) en la fase adulta, hasta 45mm de largo de *Dipetalogaster maxima*, ambas de México⁷¹.

Generalmente su cuerpo es de color marrón o negro, aunque muchas especies poseen bandas de colores como el amarillo, rojo, naranja o rosa en el conxivo, nombre con el que se designan a las porciones laterales de los segmentos abdominales. Su característica principal es la proboscis de tres segmentos, de donde los triatomos toman su nombre: tri=tres, tomos=partes; dicha estructura es recta y delgada, adaptada para perforar el integumento blando de los vertebrados⁷¹.

El ciclo de vida de los triatomos incluye el huevo, cinco estadios ninfales y adulto; y su duración es variable dependiendo de la especie y la disponibilidad de huéspedes. La mayoría de las especies completan su ciclo entre 5 y 12 meses en condiciones óptimas y toleran un rango de 30 a 80% de humedad relativa; el rango ideal de temperatura oscila entre 24 y 28°C^{49,72}.

El triatoma es conocido en la población rural y dependiendo del estado, recibe alrededor de 40 nombres diferentes. Los más comunes son: chinche picuda, botijillas, mesquites, chinche hocicona, chilasca, chupasangre, chinche besucona, hijacamat, corucos, chinche del monte, chumil, talaje. Chinche trompuda, pick, jumiles, pedorrillos, entre otros⁷³.

En México se señala a *Triatoma barberi*, *T. dimidiata* y *T. pallidipennis* como los transmisores de *T. cruzi* más importantes hasta el momento, los cuales tienen hábitos domésticos marcados, ya que se han encontrado dentro de la vivienda humana desde el huevo, pasando por los distintos estadios ninfales hasta el adulto, por lo que el hombre es su principal fuente de alimento^{7,51,74,75}.

Los triatomos se adaptan y proliferan en la vivienda humana, cuando además de la alimentación encuentran un ambiente propicio, al estar construida con material

inadecuado en el que predomina el barro, la paja, las ramas, las hojas de palma y otros elementos favorecedores de la formación de grietas y hendiduras en las cuales se esconden dichos insectos. También se pueden encontrar en zonas peridomiciliares como gallineros o corrales, por lo que las deficientes condiciones de la vivienda mantienen las endemias chagásicas^{47,51,76}.

2.3.3 Distribución geográfica

En la Republica Mexicana, Carlos Hoffman en 1928 hace el primer reporte de este insecto al encontrar un ejemplar de *Triatoma dimidiata*, en el estado de Veracruz. Luis Mazzotti en 1936 notifica por primera vez un elevado porcentaje de triatomínicos naturalmente infectados en Tututepec Oaxaca, por lo cual dirige sus investigaciones para la búsqueda de casos humanos^{22,75}. En México se han reportado siete géneros: *Belminus*, *Dipetalogaster*, *Eratyrus*, *Pastrongylus*, *Paratriatoma*, *Rhodnius* y *Triatoma*, esta última con alrededor de 24 especies distribuidas en todos los estados, por lo que es considerado el país latinoamericano que más población de triatomínicos tiene⁷⁷.

2.4 Reservorios

La infección natural en mamíferos silvestres ha sido reportada desde Maryland, Estados Unidos hasta la provincia de Mendoza en Argentina⁷⁴.

Los reservorios vertebrados, que se han reportado en México, corresponden a 18 especies: *Didelphis marsupilis* (tlacuache); *Dasyus novemcinctus mexicanus* (armadillo); *Canis familiaris* (perro); *Rattus norvegicus* (rata noruega); *Felis domesticus* (gato); *Mus musculus* (ratón doméstico); *Scirus vulgaris* (ardilla); *Bos taurus* (toro); *Sigmodon hispidus* (rata de algodón); *Otodylomys phyllotis* (ratón de campo); *Tyloma nudicaudus* (ratón de árbol); *Carrollia perspicillata* (murciélago); *Liomys* sp. (ratón de campo); *Peromyscus* sp. (ratón de campo); *Martes americanus* (marta); *Equus asinus* (burro); *Suis scrofa* (cerdo) y *Neotoma micropus* (ratón de campo)⁷⁶.

Sólo en doce estados de la República Mexicana se han capturado reservorios infectados con *T. cruzi*. La mayor parte del territorio nacional continua sin mayores datos, debido a que se han realizado escasos estudios al respecto⁷⁶.

3. JUSTIFICACIÓN

T. cruzi presenta un pleomorfismo natural, al cual se atribuye la patología con que se presenta la infección en el humano y otros huéspedes. Con base en esto, existen trabajos sobre caracterización de aislados de *T. cruzi*, que abarcan aspectos biológicos, bioquímicos y moleculares como intentos de clasificación de las diferentes cepas del parásito.

La caracterización de *T. cruzi* a nivel de cepa es mucho mas difícil y el tema es objeto de intensas investigaciones en la actualidad. Los estudios comparativos son importantes para determinar el papel que desempeñan las diferentes cepas en aspectos relacionados con la patogenia, virulencia, presentación de las diferentes formas clínicas y por ende en la morbi-mortalidad en el humano por área geográfica.

Debido a los escasos reportes de caracterización biológica e inmunoquímica que existen sobre *T. cruzi* en nuestro país, es importante realizar estudios que sirvan como base para investigaciones posteriores.

4. HIPÓTESIS

El ciclo biológico de *T.cruzi* esta relacionado con un conjunto de diversas poblaciones que circulan entre vectores, el hombre, reservorios silvestres y domésticos, así pues su comportamiento puede estar influenciado tanto como por el vector como por el huésped vertebrado o por las condiciones del medio ambiente, por lo tanto se piensa que existe una gran variación intraespecífica entre los diferentes aislados de *Trypanosoma cruzi*.

5. OBJETIVOS

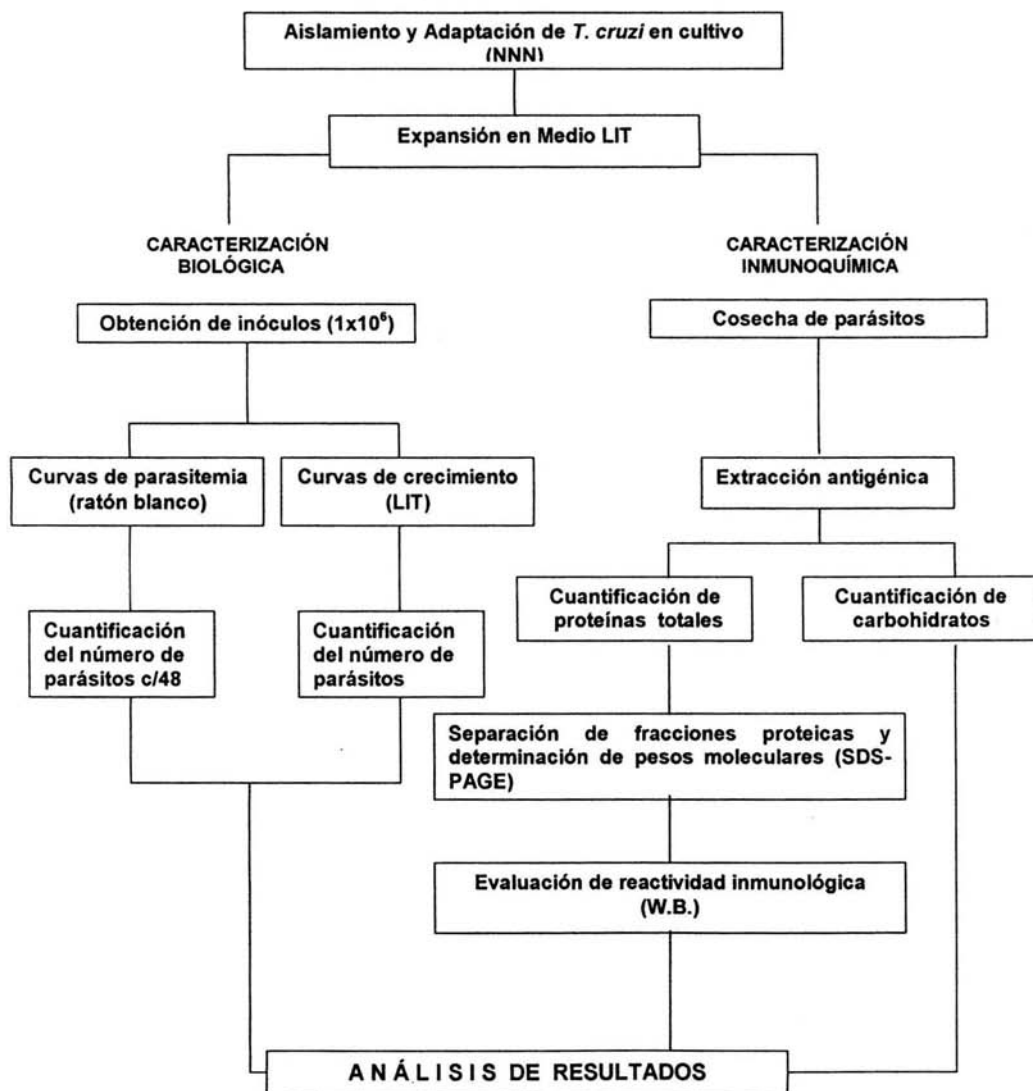
Objetivo General

- Comparar algunas características biológicas e inmunoquímicas de cuatro aislados de *T.cruzi*.

Objetivos Particulares

- Caracterizar el comportamiento biológico de los cuatro aislados.
- Comparar las concentraciones proteicas y de carbohidratos totales de los cuatro aislados.
- Separar los componentes glucoproteicos y determinar sus pesos moleculares.
- Evaluar y comparar la reactividad inmunológica de los componentes por electroinmunotransferencia.

6. DISEÑO EXPERIMENTAL



7. METODOLOGÍA

7.1. Obtención de aislados de *Trypanosoma cruzi*

Se emplearon cuatro aislados de *Trypanosoma cruzi*, obtenidos de 4 diferentes especies de vectores naturalmente infectados; los ejemplares de triatomíneos fueron colectados por personal del Laboratorio de Biología de Parásitos de la Facultad de Medicina de la UNAM, en diferentes localidades de la República Mexicana. (Tabla 1)

Tabla 1. Aislados de *Trypanosoma cruzi* utilizados en el estudio.

Aislado de <i>T. cruzi</i>	Vector	Localidad	Fecha de aislamiento
Querétaro (Qro)	<i>T. barberi</i>	La Cueva, Querétaro	1986
Tequesquitengo (TQ)	<i>T. pallidipennis</i>	Tequesquitengo, Morelos	1992
Xalapa (Xal-615)	<i>T. dimidiata</i>	Xalapa, Veracruz	2003
Guanajuato (Gto)	<i>T. mexicana</i>	Sta. Catarina y Tierra Blanca, Guanajuato	2003-2004

7.2 Siembra del parásito en medios de cultivo

Todos los aislados fueron obtenidos a partir del contenido intestinal de triatomíneos infectados con *Trypanosoma cruzi* capturados en campo, inoculando ratones blancos (*Mus musculus*) de 15-20 gr. (cepa CD-1) por vía intraperitoneal. Los aislados Querétaro y Tequesquitengo fueron aislados en el Laboratorio de Biología de Parásitos previamente y han sido mantenidos en el mismo, en ratón blanco; los aislados Xalapa - 615 y Guanajuato se aislaron durante la fase experimental del presente trabajo.

Para inducir la defecación y obtener las heces, los triatomíneos fueron estimulados presionando ligeramente el abdomen. Las deyecciones se colocaron sobre un portaobjetos y se mezclaron con 1 a 2 gotas de solución salina isotónica; se

colocó un cubreobjetos y se observó al microscopio a 10X y 40X para identificar al parásito.

Con el contenido intestinal de los triatominos que resultaron positivos se inocularon medios de cultivo bifásicos (NNN) para adaptar y mantener los parásitos; la revisión y eliminación de contaminantes mediante pases consecutivos se realizó cada ocho días posteriores a la siembra. Una vez adaptados y sin contaminantes, se procedió a realizar la expansión de los mismos en medio de cultivo monofásico (LIT) con el fin de obtener epimastigotes para utilizarlos en la extracción de antígenos.

7.2.1 Determinación de curvas de crecimiento

Se sembraron 1×10^6 parásitos/ml. en tubos de vidrio con tapón de rosca conteniendo 3ml. de medio monofásico LIT y se incubaron a 28°C para iniciar la determinación de las curvas de crecimiento. El número de parásitos se determinó tomando 10 µl del cultivo haciendo diluciones 1:10 y 1:100 con solución salina; el conteo se realizó en Cámara de Neubauer, el resultado se calculó tomando en consideración las diluciones realizadas y se expresó en número de parásitos/ml. Las lecturas se evaluaron cada 24 hrs. durante 30 días, considerando el día de siembra como tiempo cero. Con los datos obtenidos se construyeron las curvas de crecimiento para cada aislado.

7.3 Infección en ratón blanco

Los parásitos fueron obtenidos de la forma descrita anteriormente para los cultivos. Se inocularon 10 ratones ♀ (*Mus musculus*) de la cepa CD-1 de 15-20 gr. por vía intraperitoneal para obtener las formas sanguíneas del parásito.

7.3.1 Determinación de curvas de parasitemia

Para cada aislado, además de los 10 ratones inoculados se empleó un ratón inoculado con PBS estéril como control. El número de parásitos se determinó extrayendo 10 µl de sangre de la cola del ratón, haciendo diluciones 1:10 y 1:100

con solución salina isotónica. El conteo se realizó en cámara de Neubauer y el resultado se expresó en número de parásitos/ml. de sangre. Las lecturas se realizaron cada 48hrs. durante 30 días y con los datos obtenidos se construyeron las curvas de parasitemia.

7.4 Obtención de antígenos parasitarios

Una vez expandido el parásito en medio de cultivo LIT, se procedió a la cosecha y extracción de antígenos parasitarios al final de la fase de crecimiento *log*, momento en que el parásito se encontraba en fase de epimastigote. Se cuantificaron los volúmenes de medio de cultivo para evaluar al final, rendimientos parasitario y proteico.

7.4.1 Cosecha de parásitos

Los parásitos fueron cosechados por centrifugación y lavados con PBS pH 7.2 a 7000 rpm durante 15 minutos (Sorvall RC 26 Plus) a 4°C; el último lavado se hizo con solución salina isotónica (SSI) a la misma temperatura, los sobrenadantes fueron desechados en cada lavado; a la masa húmeda obtenida se le adicionó PMSF (fenil-metil-sulfonil-fluoruro) a una concentración de 2mM como inhibidor de proteasas. La masa húmeda se cuantificó y almacenó a -35°C hasta la extracción antigénica.

7.4.2 Extracción antigénica

La masa parasitaria se diluyó 1:20 con una solución de tioglicolato de sodio 1:1000. A partir de esta solución se realizó la ruptura de parásitos con un homogenizador de tejidos Tekmar Tissumizer SDT-1810 a 2000 rpm en baño frío (hielo-etanol) durante 15 minutos, el material obtenido se centrifugó a 2500 rpm a 4°C durante 15 minutos para obtener el antígeno crudo (sobrenadante); este se isotonizó con NaCl, se fraccionó en alícuotas de 1ml. en criotubos de tapón de rosca y se conservó a 4°C durante 48 hrs. y posteriormente se almacenó en congelación a -35°C hasta su empleo.

7.4.3 Cuantificación de proteínas

La concentración de proteínas totales se determinó por método de Lowry modificado, construyendo una curva patrón con albúmina sérica bovina (BSA .001g/ml). Se realizaron diferentes diluciones del antígeno obtenido de cada aislado para seleccionar la que presentaba lecturas (D.O.) cercanas a la parte media de la curva patrón y calcular así la concentración final por ml.

7.4.4 Cuantificación de carbohidratos

La concentración de carbohidratos totales se determinó por método de Dubois (fenol-sulfúrico), construyendo una curva patrón con glucosa (0.001g/ml). Se realizaron diluciones del antígeno obtenido de cada aislado para calcular la concentración final igual que en el caso anterior.

7.4.5 Separación de componentes proteicos y determinación de pesos moleculares por electroforesis en poliacrilamida (SDS-PAGE)

La separación por peso molecular de los extractos antigénicos se realizó mediante electroforesis en geles de poliacrilamida al 12.5% con dodecil-sulfato de sodio 10% (SDS-PAGE). Se siguió en términos generales el método descrito por **Laemmli en 1970**, en un equipo Mini-Protean II Electrophoresis Cell (Bio-Rad*) a un voltaje constante de 150 volts durante aproximadamente 70 min. Se usó un amortiguador de corrimiento constituido por 0.025 M Trizma-base (Tris [hidroximetil] aminometano), 0.192 M glicina y dodecil-sulfato de sodio (SDS) al 0.1%, pH 8.3. Las muestras fueron preparadas en un amortiguador constituido por 3.125 mL de Trizma-base 1 M pH 6.8, 5 ml de glicerol, 1.25 ml de SDS al 10%, 2.5 ml de β mercaptoetanol, 2.5 mg de azul de bromofenol y agua desionizada para aforar a 25 ml y se sometieron junto con los marcadores de peso molecular a ebullición en baño maría durante 5 min. Las muestras contenían 148 μ g en TQ, 160 μ g en Qro. y 54 μ g en Xal por carril correspondiente. Los marcadores de peso molecular utilizados fueron comerciales, de amplio rango (Gibco). Después de la electroforesis, el gel fue teñido con azul de Coomassie R-250 (Sigma) durante 10 minutos.

7.4.6 Electroinmunotransferencia de componentes proteicos

Después de la electroforesis, las proteínas fueron transferidas a nitrocelulosa con poro de 0.45 μm (Bio-Rad) en un aparato Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer (Bio-Rad) a 12 volts durante 22 min, con un amortiguador de transferencia constituido por Tris-base 0.025 M, glicina 0.192 M. después de concluida la transferencia, el papel de nitrocelulosa se bloqueó con PBS/Tween 20 0.3% /leche 5% durante 2 hrs. a temperatura ambiente en agitación ligera. Se realizaron 2 lavados rápidos con PBS/Tween 20 0.3% y se incubaron los sueros testigo reactivos a *T. cruzi* en dilución 1:70 a 4°C en agitación ligera durante la noche. Se realizaron tres lavados con PBS-Tween 20 0.3% y posteriormente se incubó con el conjugado anti IgG unido a peroxidasa (Zyemed) en dilución 1:5000, durante 2 hrs. a temperatura ambiente. Se realizaron 5 lavados y se colocó en oscuridad el sustrato correspondiente DAB (3,3 diaminobenzidina) en una solución de Tris HCl-50mM pH 7.6 con peróxido de hidrógeno al 30%. La reacción se frenó con agua destilada. La nitrocelulosa se dejó secar y se conservó a temperatura ambiente hasta realizar la evaluación de reactividad antigénica así como identificación de estos componentes por peso molecular.

8. RESULTADOS

8.1 Determinación de curvas de crecimiento y parasitemia

En la curva de crecimiento del aislado TQ en el cultivo, se observaron parásitos a partir del día siete, con densidades parasitarias entre 3 y 56×10^6 parásitos/ml, el final de la fase de crecimiento exponencial, donde se detectaron los valores máximos de crecimiento se presentó el día 17; la fase estacionaria abarcó los días 18, 19 y 20 y la fase de declinación empezó a partir del día 21 con un ligero aumento los días 22 y 23 seguido de la declinación parasitaria llegando a cero el día 28 (Fig. 4).

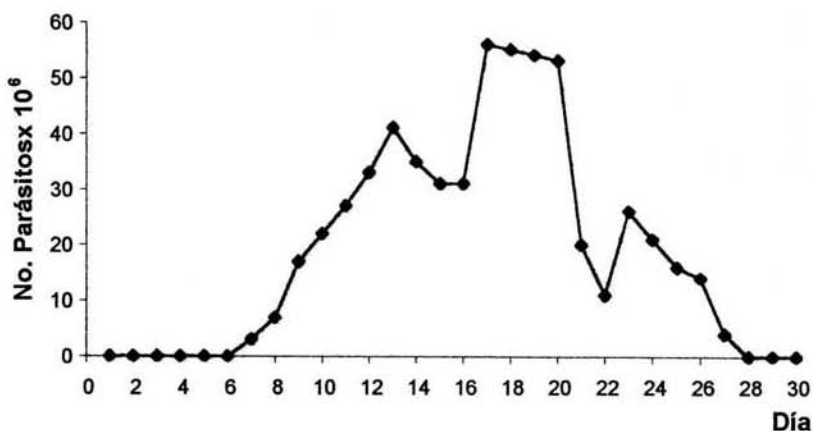


Figura 4. Cinética de crecimiento del aislado TQ

La curva de parasitemia del aislado TQ está representada por el promedio de los 10 ratones inoculados. Se observó una densidad entre 1 y 44×10^6 parásitos/ml de sangre. Se presentaron dos picos de crecimiento máximo los días 3-4 y el día 13. Con fluctuaciones en el número de parásitos, los ratones a partir del día 3 y 4, presentaban el pelo erizado y alrededor del día 15 se presentó en la mayoría de ellos parálisis de las extremidades posteriores. La declinación de la curva se inició el día 14 llegando a cero el día 27 (Fig. 5).

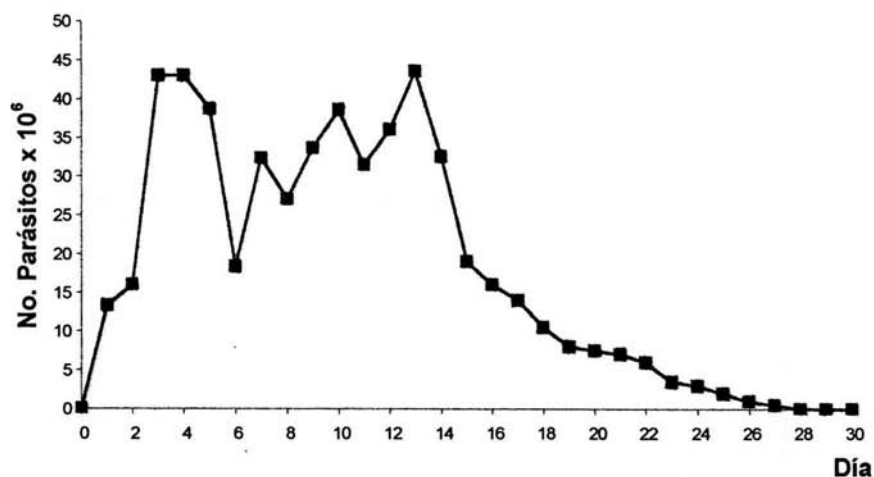


Figura 5. Cinética de parasitemia del aislado TQ

En la curva de crecimiento del aislado Qro. en el cultivo, se presentaron las densidades parasitarias entre 1 y 36×10^6 parásitos/ml, el final de la fase de crecimiento exponencial, donde se detectaron los valores máximos de crecimiento se presentó el día 9; la fase estacionaria abarcó los días 9, 10 y 11 y la fase de declinación empezó a partir del día 12 llegando a cero el día 28 (Fig. 6)

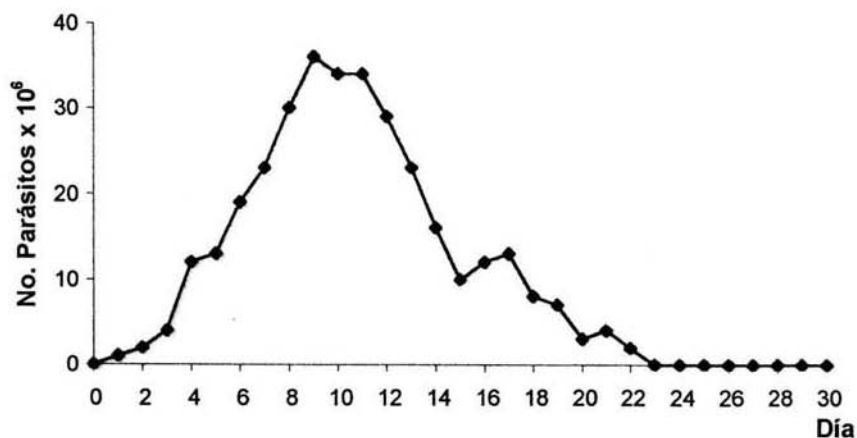


Figura 6. Cinética de crecimiento del aislado Qro.

La curva de parasitemia del aislado Qro. está representada por el promedio de los 10 ratones inoculados. Se observó una densidad entre 2 y 21×10^6 parásitos/ml de sangre. Se presentó el máximo crecimiento el día 6 y los ratones presentaban el pelo erizado y parálisis de las extremidades posteriores. La declinación de la curva se inició el día 7, seguido de la muerte de los ratones el día 8 (Fig. 7).

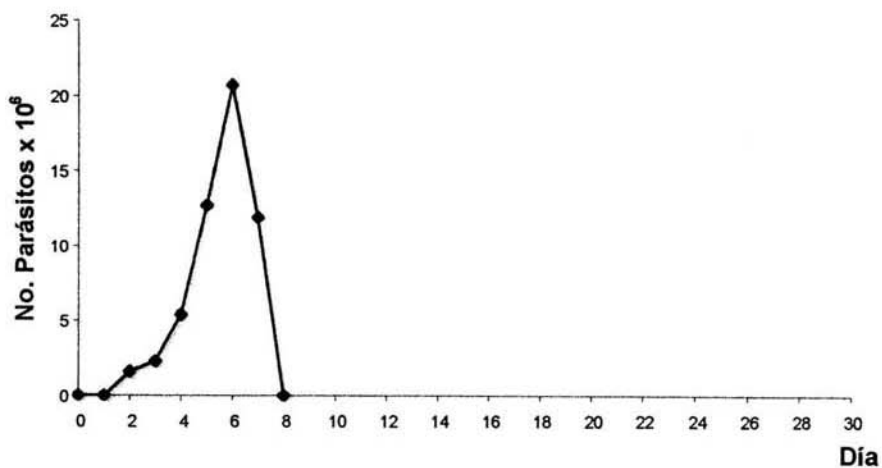


Figura 7. Cinética de parasitemia del aislado Qro.

En la curva de crecimiento del aislado Xal. en el cultivo, se observaron parásitos a partir del día 2, con densidades parasitarias entre 2 y 52×10^6 parásitos/ml, el final de la fase de crecimiento exponencial, donde se detectaron los valores máximos de crecimiento se presentó el día 6; la fase estacionaria abarcó los días 5 y 6 con 2 picos de ascenso los días 9 y 15 y la fase de declinación empezó a partir del día 16 llegando a cero el día 25 (Fig. 8).

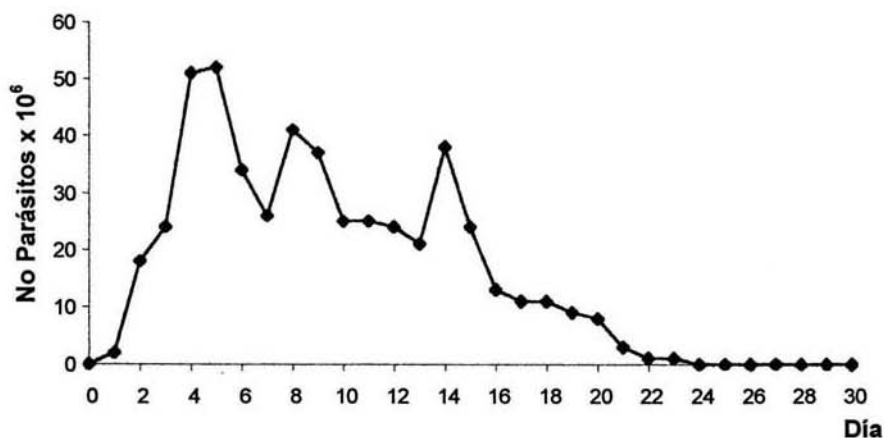


Figura 8. Cinética de crecimiento del aislado Xal.

La curva de parasitemia del aislado Xalapa esta representada por el promedio de los 10 ratones inoculados. Se observó una densidad entre 1 y 12×10^6 parásitos/ml de sangre. El máximo crecimiento lo presentó el día 12 y 14 y los ratones presentaban parálisis en las extremidades posteriores. La declinación de la curva se inició el día 15, seguido de la muerte del total de los ratones el día 18. (Fig. 9)

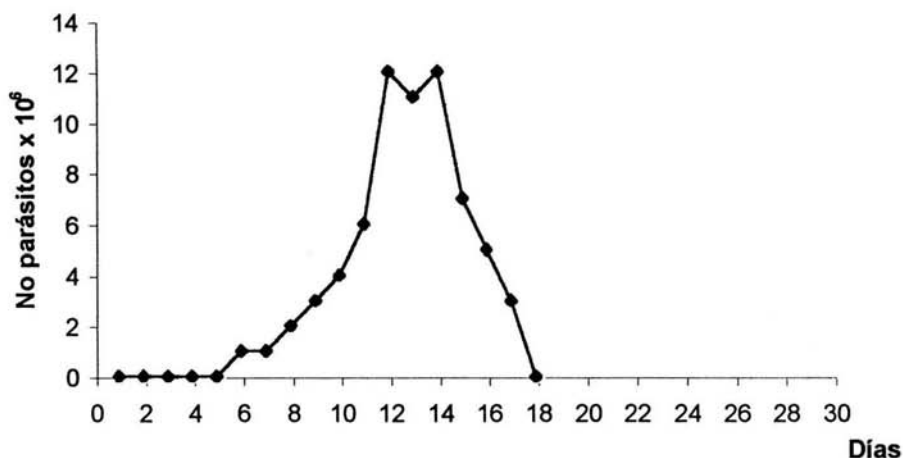


Figura 9. Cinética de parasitemia del aislado Xalapa

Respecto al aislado Gto., se capturaron 110 triatomíneos de los cuales 5 fueron positivos a *T. cruzi*, de éstos últimos, se realizó siembra en cultivos e inoculación en ratones blancos a partir del contenido intestinal al igual que en los aislados anteriores. Se realizaron revisiones semanalmente obteniéndose resultados negativos por un periodo de 90 días. Al no lograrse el aislamiento del parásito tanto *in vivo* como *in vitro* no se realizaron los estudios posteriores.

8.2 Cuantificación de proteínas y carbohidratos

Los resultados de las cuantificaciones totales de proteínas y carbohidratos se describen a continuación en la Tabla 2.

Tabla. 2 Cuantificación de proteínas y carbohidratos

Aislado	[] Proteínas mg/ml	[] Carbohidratos mg/ml	% Proteínas	% Carbohidratos
TQ	2.82	0.804	77.81	22.18
Qro	3.06	1.58	65.94	34.05
Xal	1.04	0.875	54.30	45.69

8.3 Separación de componentes proteicos y determinación de pesos moleculares por electroforesis

En los 3 aislados, se aprecian múltiples componentes con pesos moleculares entre 85 y 9 kDa, presentando mayor relevancia los de 85, 75, 74, 58, 47, 42, 37, 32, 30, 25, 21, 17 y 9 kDa según se aprecia en la Figura 10.

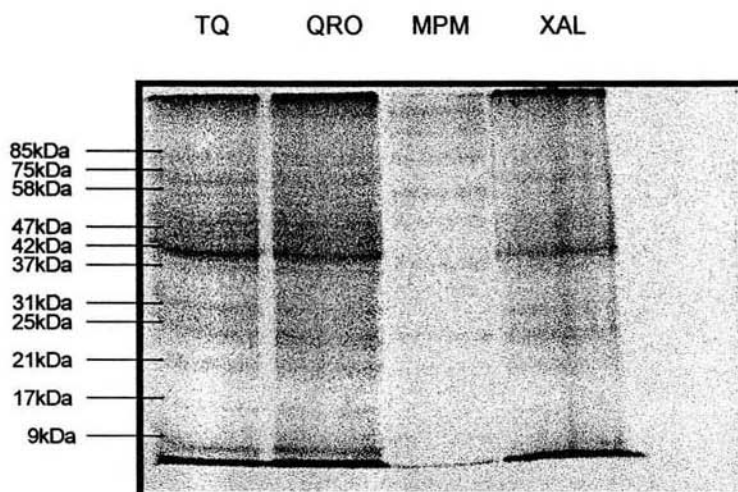


Figura 10. SDS-PAGE de los 3 extractos antigénicos TQ Tequesquitengo, QRO Querétaro, XAL Xalapa y MPM-Marcadores de peso molecular.

8.4 Electroinmunotransferencia de extractos antigénicos

Los patrones de reconocimiento para los 3 aislados fueron también similares entre sí. Se aprecia reactividad a *T. cruzi* en 8 componentes con pesos moleculares entre 180 y 21 kDa siendo los de mayor relevancia entre los de 180, 72, 42, 37, 32, 30 y 25 kDa según se aprecia en la Figura 11.

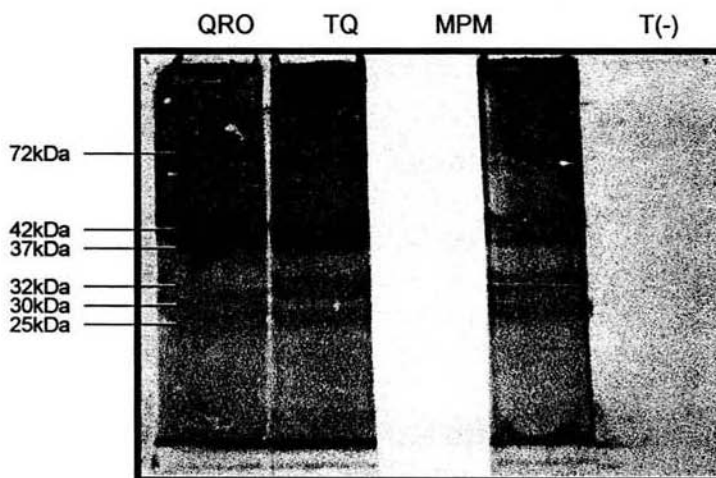


Figura 11. Electroinmunotransferencia de los 3 extractos antigénicos TQ Tequesquitengo, QRO Querétaro, XAL Xalapa, MPM-Marcadores de peso molecular y T(-) suero testigo negativo

9. DISCUSION

El comportamiento biológico de los cuatro aislados estudiados, reveló parasitemias de variable intensidad en los ratones inoculados vía intraperitoneal, con parasitemias iniciales a partir del primer día post-inoculación, densidades a partir de 1 y hasta 44×10^6 parásitos/ml. La mortalidad acumulada de los ratones alcanzó altos porcentajes hasta del 100% en el caso del aislado mas virulento (Qro) y (Xal) que se puede considerar medianamente virulento, ya que presenta mortalidad total de los ratones pero en mayor tiempo que (Qro), cabe resaltar que el aislado menos virulento (TQ), presentó la densidad parasitaria mas alta con 44×10^6 , lo que muestra una intensa multiplicación del parásito en el torrente sanguíneo del ratón, pero con diversas fluctuaciones en cuanto a número de parásitos durante el curso de la infección. En medio de cultivo el comportamiento fue similar, ya que el aislado mas longevo fue el de TQ. En Qro la densidad fue la menor con 36×10^6 parásitos/ml; los aislados de Xal y TQ, presentan una densidad similar de 3 a 56 y 2 a 52×10^6 parásitos/ml respectivamente, pero en relación al máximo crecimiento, fase estacionaria y decrecimiento son totalmente distintas.

Las concentraciones de proteínas y carbohidratos, muestran diferencias en cuanto a la relación porcentual proteína - carbohidrato, donde se aprecia a TQ con 78%, Qro con 66% y Xal con 54%; lo que llama la atención ya que algunos investigadores refieren estos porcentajes entre el 40 y 56% (Von Brand, 1996). Estas concentraciones probablemente estén relacionadas con el grado de virulencia y patogenicidad de los aislados, sin embargo éstas concentraciones de proteínas y carbohidratos no siempre determinarán el comportamiento biológico en el huésped vertebrado donde intervienen otros factores inmunológicos.

Los patrones electroforéticos y antigénicos de los extractos de los tres aislados fueron muy similares entre sí con la presencia de algunos componentes ya descritos por otros investigadores, algunos de ellos ampliamente estudiados con

finés diagnósticos, así como su participación molecular en la interiorización del parásito – célula huésped. El componente de 25 kDa ha sido muy estudiado para diagnóstico y ha sido propuesto en el uso de un antígeno monoclonal; se encuentra en la superficie de todas las fases del parásito y presenta buena reactividad en sueros de individuos con diferentes cuadros clínicos y de diversas áreas geográficas, sin presentar cruce con *Leishmania* sp. El componente de 85 kDa está involucrado en el proceso de interiorización del parásito a la célula huésped por la presencia de ácido siálico en su composición. El componente de 75 kDa se ha identificado en amastigotes y tripomastigotes metacíclicos, por lo cual se propone su uso con fines inmunoprolácticos. El componente de 58 kDa se ha responsabilizado de inhibir la unión celular con el factor C3 de la vía alterna del complemento humano.

10. CONCLUSIONES

El aislado de Querétaro fue el más virulento por la elevada mortalidad en los ratones y el de Tequesquitengo fue el menos virulento de los tres.

El comportamiento biológico de los aislados es diferente dependiendo del vector del que provenga.

Los tres aislados tienen variación intraespecífica, comprobada por las características biológicas e inmunoquímicas encontradas.

Se confirma la presencia de conjugados glucoproteicos que participan en la relación parásito - célula huésped (85, 75, 58 y 25 kDa,)

Los extractos proteicos de los aislados tienen reactividad a *T. cruzi*, con lo que se comprueba su inmunogenicidad en el huésped humano.

11. BIBLIOGRAFÍA

1. **Levine** N.D., Corliss J.O., Cox F.E.G., de Roux G., Grain J., Honighberg B. M., Leedale G.F., Loeblich A. R., Lom J., Lynn D., Merinfeld E.G., page E.C., Poljansky G., Sprague V., Vavra J. and Wallace F.G. (1980). A newly revised classification of the protozoa. *J. Protozool.* 27:1-37
2. **Chagas** C. 1909. Nova Tripanozomíase humana. Estudos sobre a morfología e o ciclo evolutivo do schizotrypanum cruzi n. Gen., N. SP., agente etiológico de nova entidade morbida do homem. *Inst. Oswaldo Cruz.* 1:159-218
- 3.- **Schofield** C.J. 2000. Challenges of Chagas disease vector control in Central America. WHO/WHOPES. 36pp.
4. **Rangel** Aldao R., Allende D., Triana F., Piras R., Enriquez D., piras M. 1987. Possible role of AMP cyclic in the differentiation of *Trypanosoma cruzi*. *Biol. Biochem. Parasitol.* 22: 39-43
5. **Lammel** EL., Muller LA., Isola LD:, González Cappa SM. 1985. Effect of vector on infectivity of *T. cruzi*. *Acta Trópica.* 42: 149-55.
6. **Magalhaes** JB., Andrade SG:, Sherlock Y. 1996. *Trypanosoma cruzi* strains: behavior after passage into autochthonous or foreign species of triatomine (biological and biochemical patterns). *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo.* 38: 23-8.
7. **Tay, J, H. Schenone, J.T. Sánchez y L. Robert.**1992. Estado actual de los conocimientos sobre la enfermedad de Chagas en la República Mexicana. *Boletín Chileno de Parasitología.* 47:43-53.
8. **Brener** Z. 1985. General review on *Trypanosoma cruzi* classification and taxonomy. *Rev Soc Bras med Trop.* 18(suppl): 1-8

9. **Andrade S**, Andrade Z. 1966. Doença de Chagas e Alterações Neurônais no plexo de Auerbach. Rev Inst Med Trop Sao Paul. 8: 219-224.
10. **Dvorak JA**. 1985. Host parasite relationships at the cellular level in *Trypanosoma cruzi* infection. Scientific Publication Washington: Panamerican Health organization; 347: 1-10.
11. **Melo RC**., Brener Z: 1978. Tissue tropism of different *Trypanosoma cruzi* strains. J Parasitol; 64: 475-82.
12. **Organización Mundial de la Salud**. 1991. Control de la enfermedad de Chagas. Informe de un Comité de Expertos de la OMS. pp 11-15
13. **Pereira M. E. A.**, Lourdes M. A., Villalta F., Andrade A. F. B. 1980. Lectin receptors as markers for *Trypanosoma cruzi*: developmental stages and study of the interaction of wheat germ agglutinin with sialic acid residues on epimastigote cell. J. Exp. Med. 152: 1375.
14. **Snary D.**, Hudson L. 1979. *Trypanosoma cruzi* cell surface proteins: identification of the mayor glycoprotein. F. E. B. S. Lett. 100:166.
15. **Araujo F. G.**, Handman E., Remington J. S. 1980. Binding of lectins to the cell surface of *Trypanosoma cruzi*. J. Protozool. 27:397
16. **Dvorak J. A**. 1984. The Natural Heterogeneity of *Trypanosoma cruzi*: Biological and Medical Implications. Journal of cellular Biochemistry 24: 357-371
17. **López-Olmos V.**, Pérez-Nasser N., Piñeiro D., Ortega E., Hernandez R., Espinoza B. 1998. Biological characterization and genetic diversity of mexican isolates of *Trypanosoma cruzi*. Acta Tropica 69: 239-254.

18. **Galvan S.C.**, Rubio J., Sánchez R., Ortega J., Castañeda M. 1983. Phenetic variation in *Trypanosoma cruzi* (*Schizotrypanum*) isolates. *Comp. Biochem Physiol. B* 74: 573-578.
19. **Zavala-Castro J. E.**, Velasco-Castrejon O., Hernández R. 1992. Molecular characterization of mexican stocks of *Trypanosoma cruzi* using total DNA. *Am. J. trop. Med. Hyg.* 47: 201-209.
20. **Hoffman C.** 1928. Nota acerca de un probable transmisor de la Trypanosomiasis humana en el estado de Veracruz. *Rev. Mex. Biol.* 8: 12-18
21. **Mazzotti L.** 1936. Investigación sobre la existencia de la Enfermedad de Chagas en el país. Demostración de los *Trypanosomas* en reduvídeos transmisores. *Medicina Mex.* 282(16): 584-5.
22. **Mazzotti L.** 1940. Dos casos de la Enfermedad de Chagas en el estado de Oaxaca. *Gac. Med. (México).* 70: 417-420.
23. **Tay J.**, Salazar P. M., Ontiveros. 1969. El comportamiento en el ratón blanco de una cepa de *Trypanosoma cruzi* mediante pases sucesivos en diferentes especies de triatomas. *Rev. Latinoamericana Microbiol. Parasitol.* 11: 79-89.
24. **Tay J.**, Salazar P. M., CastilloM., Ortega M. 1973. Estudio sobre seis cepas mexicanas de *Trypanosoma cruzi*. *Rev. Inv. Salud Pública (México).* 33: 67-78.
25. **Tay J.**, Salazar P. M., Ontiveros D. 1969. El comportamiento en el ratón blanco de una cepa de *Trypanosoma cruzi* mediante pases sucesivos en diferentes triatomas. *Rev. Latinoamer. Microbiol. Parasitol.* 11:79-89

26. **Brener Z.**, Chiari E., Alvarenga J. 1974. Observations on *Trypanosoma cruzi* strains maintained over an 8-year period in experimentally inoculated mice. Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo. 16 (1): 39-46.
27. **Salazar P. M.**, Tay J., Navarrete F., Ramos S. 1975. Comportamiento en el ratón blanco de una cepa de *Trypanosoma cruzi* de peculiar virulencia. Rev. Inv. Salud Pública (México). 35: 37-45.
28. **Segura E. L.**, Vázquez C., Bronzina A., Campos J. M., Cerisola J. A., Gonzales S. M. 1977. Antigens of the subcellular fractions of *Trypanosoma cruzi*. II. Flagellar and membrane fraction. J. Protozool. 24 (4): 540-543.
29. **Segura E. L.**, Vázquez C., Bronzina A., Campos J. M., Cerisola J. A., Gonzales S. M. 1974. Antigenic makeup of subcellular fraction of *Trypanosoma cruzi*. J. Protozool. 24 (4)
30. **Salazar P. M.**, Jimenez J., Tay J., Cárdenas L. 1978. Estudio comparativo de la patogenicidad de cuatro cepas de *Trypanosoma cruzi* en el ratón blanco. Rev. Latinoamer. Microbiol. 20: 51-57.
31. **Romanha A. J.**, Pereira A. A., Chiari E., Kilgour V. 1979. Isoenzyme patterns of cultured *Trypanosoma cruzi*: changes alter prolonged subcultura. Comp. Biochem. Physiol. 628: 139-42.
32. **Araujo G.** 1981. Characterization of stages and strains of *Trypanosoma cruzi* by analysis of cell membrane components. The Journal of Inm. Vol. 127 No. 3.
33. **Tybayrenc M.**, Miles M. 1983. A genetic comparison between Brazilian and Bolivian zymodemes of *T. cruzi*. Trans R. Soc. Trop. Med. II yg. 77: 79-83.

34. **Salazar P. M.**, Tay J., Bucio M. I., Haro I., Anzures M. E., Flores S. 1984. Primer caso de megaesófago con serología positiva a *Trypanosoma cruzi*. Salud Púb. Mex. 26: 452-455.
35. **Andrade S.**, Magaliiales J. 1997. Biodemes and zymodemes of *Trypanosoma cruzi* strains: correlations with clinical data and experimental pathology. Rev. Soc. Bras. Med. Trop. 30: 27-35.
36. **Bucio M. I.**, Cabrera M., Segura E. L., Zenteno E., Salazar P. M. 1999. Identification of immunodominant antigens in mexican strains of *Trypanosoma cruzi*. Immunological Investigations. 28 (4): 268.
37. **Zaidenberg A.**, Tournier H. A., Schinella G. R., Buschiazzo. 2000. *Trypanosoma cruzi*: Obtención de amastigotes extracelulares y estudio de su crecimiento en diferentes condiciones de cultivo. Rev. Latinoamer. de Microbiol. 42: 21-26.
38. **Rivera I. M.**, Moreno E. A., Gonzalez n., Lugo A. 2000. Caracterización de aislados de *Trypanosoma cruzi* del occidente de Venezuela. Rev. Ecol. Lat. Am. 7 (3): 1-10
39. **Barrera-Pérez M. A.**, Rodríguez M. E., Guzmán E., Zavala J., Dumonteil E. 2001. Biological behaviour strains of *Trypanosoma cruzi* from Yucatán, México. Rev. biomed. 12: 224-230.
40. **Pereira M.E.A.** 1990. Cell biology of *Trypanosoma cruzi*. In: Wyler J.D. Editor. Modern parasite Biology: cellular, immunological and molecular aspects. New York: W.H. Freeman and company, 1990: 64-78
41. **Guzmán, B. C.**, S. Lahuerta y O. Velasco. 1998. Chagas disease. First congenital case report. Archives of Medical Research. 29 (2): 195-196

42. **Haro**, I.A., P. M. Salazar y M. Cabrera. 1995. Diagnóstico morfológico de las parasitosis. 2ª. Edición . Méndez Editores. México. 289 pp.
43. **Tay J.**, y cols. 1980. Evolución del *Trypanosoma cruzi* cepa mexicana en el huésped vertebrado, invertebrado e *in vitro*. Salud pública de México. 22(5): 513-520.
44. **Souza W.** 1984. Cell Biology of *T. cruzi*. International Review of Cytology. Vol. 86: 197-283.
45. **Prata**, A.M. 1994. Chagas' disease. Infectious Disease Clinics of North America. 8 (1): 61-76 pp.
46. **Atias A.** 1991. Parasitología Clínica. Ed. Mediterráneo. 3ª ed. México. 618pp.
47. **Ojeda-Luna**, M. Murguía P. 1998. Enfermedad de Chagas o Tripanosomiasis Americana. Gaceta Médica de México. 134 (6): 757-759.
48. **Tay J.**, Velasco O., Gutiérrez M. 2002. Parasitología médica. Méndez Editores. 7ma. Ed. México. pp121-143.
49. **Pays J.F.** 1998. La trypanosomose humaine americaine 90 ans apres sa decouverte par Carlos Chagas. I.Epidemiologie et controle. Médecine Tropicale. 58 (4): 391-402
50. **Riarte**, A., C. Luna, R. Sabatiello, A. Cingara, R. Schiavelli, A. De Rissio, E. Manolo, M. García, N. Jacob, M. Pattin, m. Lauricella, E. L. Segura y M. Vásquez. 1999. Chagas' Disease in patients whit kidney transplants: 7 years of experience, 1989-1996. Clinical Infectious Diseases. 29: 561-567.

51. **Schenone**, H., y A. Rojas. 1989. Algunos datos y observaciones pragmáticas en relación a la epidemiología de la enfermedad de Chagas. Boletín Chileno de parasitología. 44: 66-86
52. **Fretes**, E.R. y S. P. De Fabro. 1995. Placenta humana chagásica: alteración estructural y histoquímica de vasos sanguíneos. Revista de la Facultad de Ciencias Médicas de Córdoba. 53 (1): 11-15.
53. **Brumpt** E., **Mazzotti** L., **Brumpt** LC. 1939. Enquetes Epidémiologiques sur la Maladie de C. Chagas au Mexique (1). Réduvidés Vecteurs. Animaux réservoirs de virus. Cas humains. Ann. Parasitol. 17: 299 – 312.
54. **Salazar** P.M. 1983. Customs which predispose to Chagas' disease and cisticercosis in México. American Journal Tropical Medicine and Hygiene. 32(5): 1179-1180.
55. **Umezawa**, S.E., M.A: **Shikanai-Yasuda**, A. **Gruber**, V. L. **Pereira** y **B. Zingales**. 1996. *Trypanosoma cruzi* defined antigens in the serological evaluation o fan outbreak of acute Chagas disease in Brazil (Catolé do Rocha, Paraíba). Memorias del Instituto Oswaldo Cruz. 97(1): 87-93.
56. **Moncayo**, A. 1992. Chagas Disease: Epidemiology and prospects for interruption of transmission in the Americas. World Health Stat. Q. 45 (2-3): 276-249.
57. **Salazar** P. M., M. I. **Bucio**, M. **Cabrera** y J. **Bautista**. 1997. Transmisión de *Trypanosoma cruzi* por transfusión sanguínea, primer caso en México. Revista Mexicana de Patología Clínica. 36 (3-4): 57-59.

58. **Salazar** P M., Haro A. I., Cabrera B. M., Bucio T.M., Rojas W. G., Ruiz H. A., Guevara G. Y. 1999. Memorias Primer Encuentro Internacional sobre Enfermedad de Chagas en México. Reunion conmemorativa del nonagésimo aniversario de la primera publicación del Dr. Carlos Chagas. Universidad Simón Bolívar. México, D.F.
59. **Moncayo** A. 1999. Progress Towards Interruption of Transmission of Chagas disease. World Health Organization, TDR, CH-1211. Geneva. 27, Switzerland.
60. **Cortez** J. M., González HJ., Reyes PA., Martínez RM., Velasco CO, De la Torre R. 1986 Chagasic cardiomyopathy in México. Revista Latinoamericana de Microbiología. 28 (3): 275-83
61. **Brener** Z., Andrade Z., 1979. *Trypanosoma cruzi* e Doença de Chagas. Río de Janeiro Brasil: Gaunabara Koogan SA. 473.
62. **Pays** J.F. 1999. La trypanosomose humaine americaine 90 ans apres sa decouverte par Carlos Chagas. II. Clinique, physiopathologie, diagnostic et traitement. Médecine Tropicale. 59 (1): 79-94.
63. **Hontebeyrie-Joscowicz**, M. 1992. Immunoregulatory mechanisms and Chagas' disease. Memorias del Instituto Oswaldo Cruz. 87(5): 101-103
64. **Botero**, D. Y M. Restrepo. 1998. Parasitosis humana. Corporación para Investigaciones Biológicas. 3° ed. Colombia. 457 pp.
65. **Von Brand** T. 1996. Biochemistry of parasites. Academia Press. New York and London.
66. **Enfermedad de Chagas y otras parasitosis**. 1996. Manual de laboratorio. Instituto Nacional de Chagas Dr. Mario Fatała Chabén. Buenos Aires Argentina.

67. **Tafari, W.L.**, 1987. Patogenia da doenca de Chagas. Inst. Med. Trop. Sao Paulo. 29:194-199
68. **Manual de laboratorio para el diagnóstico de la infección por *Trypanosoma cruzi***. 2002. UNAM, Secretaria de Salud. México.
69. **Cura E.**, Wendel S. 1994. Manual de procedimientos de control de calidad para laboratorios de serología de los bancos de sangre. Organización Panamericana de la Salud, Oficina Sanitaria Panamericana, Oficina Regional de la Organización Mundial de la Salud. Washington D.C. PAHO/HPC/HCT. pp 61
70. **Dias J. C.**, Schofield C. J. 1999. The evolution of Chagas disease (American Trypanosomiasis) control after 90 years since Carlos Chagas discovery. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 94 (1): 103-121.
71. **Schofield C. J.**: 1994. Triatominae. Biología y control. U. K: Zeneca Public Health. Laemml. 1970. U.K. Nature, 227: 680-685.
72. **Hernández-Vite, S.** 2000. Estudio epidemiológico de triatomíneos transmisores de la enfermedad de Chagas en el estado de Veracruz. Tesis de licenciatura. Facultad de Química, UNAM. México, D.F.
73. **Cabrera-Bravo, M.** 1997. Factores sociodemográficos y clínicos relacionados con la enfermedad de Chagas en hemodonantes. Tesis de maestría. Facultad de Medicina, UNAM. México. D.F. pp 85.
74. **Salazar P.M., M. Bucio, I. De Haro, J. Tay y A. Guerrero.** 1987. Reservorios y transmisores de *Trypanosoma cruzi* en el estado de Oaxaca. Salud pública de México. 29-32

75. **Salazar** P.M., I. De Haro y T. Uribarren. 1988. Chagas disease in México. *Parasitology Today*. 4(12): 348-352.
76. **Velasco**, C. O., J.P., Valdespino, R. Tapia, B. Salvatierra, C. Guzmán, C. Magos, A. Llausás, G. Gutiérrez y J. Sepúlveda. 1992. Seroepidemiología de la enfermedad de Chagas en México. *Salud Pública de México*. 34(2): 186-196.
77. **Carcavallo** R.U. y col. 1997. Bibliografic cheklist of the American triatominae (Hemiptera: Reduvidae). In Carvallo R.U. y col. *Atlas of Chagas disease vectors in America*. Vol. I Ed. Fiocruz. Río de Janeiro, Brazil. pp 15-52.
78. **Salazar** P. M., M. I. Bucio, M. Cabrera y J. Bautista. 1997. First case of natural infection in pigs. Review of *Trypanosoma cruzi* reservoirs in México. *Memorias Instituto Oswaldo Cruz*. 92 (4): 499-502.