



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA

PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

PATRONES BIOLÓGICOS, ANTIGÉNICOS Y MOLECULARES DE CLONAS
DERIVADAS DE CEPAS MEXICANAS DE *TRYPANOSOMA CRUZI*

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

DOCTOR EN CIENCIAS

P R E S E N T A

MARCO ANTONIO BECERRIL FLORES

TUTORA:
DRA. PAZ MARÍA SALAZAR SCHEITINO



2008



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.

EL PRESENTE TRABAJO DE INVESTIGACIÓN SE DESARROLLÓ EN EL LABORATORIO DE BIOLOGÍA DE PARÁSITOS, DEL DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA Y PARASITOLOGÍA DE LA FACULTAD DE MEDICINA EN LA UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO.

LOS EXPERIMENTOS DE BIOLGÍA MOLECULAR SE REALIZARON BAJO LA SUPERVISIÓN DE LA DRA. LOURDES MUÑOZ MORENO EN EL LABORATORIO A SU CARGO DENTRO DEL DEPARTAMENTO DE GENÉTICA DEL CINVESTAV DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL, Y EN EL LABORATORIO DEL DR. ROBERTO HERNÁNDEZ FERNÁNDEZ DEL DEPARTAMETO DE BIOLOGÍA MOLECULAR DEL INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO.

AGRADECIMIENTOS:

MI TOTAL AGRADECIMIENTO A LA DRA. PAZ MARÍA SALAZAR SCHETTINO POR SU POYO INCONDICIONAL Y DIRECCIÓN DE MIS ESTUDIOS DE DOCTORADO.

A MIS COMPAÑEROS Y AMIGOS DEL LABORATORIO DE BIOLOGÍA DE PARÁSITOS POR SU APOYO Y COMPAÑÍA.

A TODOS LOS ALUMNOS QUE ESTUVIERON BAJO MI ASESORÍA QUE CONTRIBUYERON A LAS INVESTIGACIONES REALIZADAS DURANTE MI ESTANCIA DOCTORAL.

AL DR. RAFAEL SAAVEDRA DURÁN POR OTORGARME LA CEPA DE CÉLULAS VERO PAA RELIZAR PARTE DE LOS EXPERIMENTOS.

DEDICATORIAS

A MIS PADRES, ANTONIO Y ÁNGELA QUE GRACIAS A ELLOS LA SEMILLA QUE SEMBRARON EN MÍ PERMITIÓ QUE LOGRARA MIS METAS COMO ESTUDIANTE, COMO HOMBRE, PERO SOBRE TODO COMO SER HUMANO.

A MIS HERMANOS EDUARDO, GUSTAVO Y REBECA QUE NUNCA FALTARON EN LOS MOMENTOS QUE LOS NECESITÉ.

A MI ESPOSA GABRIELA QUIEN SIEMPRE ME HA APOYADO CUANDO LA HE NECESITADO.

A MIS HJOS MARCO ANTONIO Y PAOLA OLIVA QUIENES HAN SIDO MI ESTÍMULO PARA VIVIR Y LUCHAR EN LA VIDA.

INDICE

RESUMEN	1
ABSTRACT	3
INTRODUCCIÓN	5
ANTECEDENTES HISTÓRICOS	7
1. Historia de enfermedad de Chagas	7
2. Enfermedad de Chagas en México	8
3. Estudios sobre cepas de <i>T. cruzi</i>	9
4. Estudios sobre clonas de <i>T. cruzi</i>	12
5. Estudios sobre triatomíneos	12
ASPECTOS GENERALES	13
1. <i>T. cruzi</i>	13
2. Ciclo biológico	15
3. Triatomíneos	16
4. Cuadro clínico	18
a. Patogenia	19
b. Manifestaciones clínicas	22
5. Caracterización de <i>T. cruzi</i>	22
a. Aislamiento de <i>T. cruzi</i>	23
b. Caracterización <i>in vitro</i>	23
c. Caracterización biológica <i>in vivo</i>	24
d. Caracterización inmunológica	25
e. Caracterización molecular	25
6. Importancia en salud pública	27

PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN	30
JUSTIFICACIÓN	30
HIPÓTESIS	30
OBJETIVOS	31
1. Objetivo General	31
2. Objetivos particulares	31
DISEÑO EXPERIMENTAL	31
MATERIALES Y MÉTODOS	32
Aislamiento e identificación de <i>T. cruzi</i>	32
Clonación y subclonación	33
Determinación de la virulencia <i>in vivo</i>.....	35
Determinación de la infectividad en cultivos celulares	36
Determinación de patrones antigénicos	37
Variabilidad interclonal intra cepa de <i>T. cruzi</i> mediante RAPDs..	40
Análisis genético de las clonas mediante la técnica de Southern-Blot.....	42
ANÁLISIS ESTADÍSTICO	44
RESULTADOS	45
Variabilidad clonal en las cepas de <i>T. cruzi</i>	45
Variabilidad en clonas aisladas de la cepa parental T5	48
Infectividad y Virulencia de las subclonas	51
Comportamiento de las clones un año después de su mantenimiento en ratones	53
Virulencia e infectividad de las clonas mantenidas en Cultivo LIT.....	55
Variabilidad antigénica de clonas de <i>T. cruzi</i>.....	57
Variabilidad molecular de las clonas de <i>T. cruzi</i>.....	57

Determinación de asociación de variables de virulencia y moleculares.....	64
DISCUSIÓN	66
CONCLUSIONES	73
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	74

RESUMEN

La enfermedad de Chagas es causada por el protozoario hemoflagelado *Trypanosoma cruzi*. Durante la infección se presenta un espectro clínico variable, desde la ausencia de síntomas hasta la observación de una fase crónica caracterizada por problemas cardiovasculares y/o gastrointestinales que pueden conducir a la muerte (Brener, 1987; Prata, 2001). Las causas exactas de esta variabilidad clínica no se conocen, sin embargo, se piensa que están involucrados tanto factores relacionados al parásito como al humano. En términos del primero se ha observado que las cepas de *T. cruzi* presentan distinto comportamiento biológico, capacidad infectiva, virulencia, características genéticas y tropismo a diferentes tejidos (Engel y cols., 1982; Andrade y cols. 1999; Buscaglia y Di Noia, 2003; Macedo y cols., 2004). En este sentido surgen varias interrogantes: ¿Cuántos diferentes tipos de cepas existen en la naturaleza? ¿Una misma cepa puede llegar a cambiar su comportamiento biológico? Se ha observado que el comportamiento puede cambiar si se les cambia de ambiente. Esto puede ser debido a que sufre cambios a nivel genético, bioquímico en su citoplasma, en su metabolismo, o bien una misma cepa no está formada por un solo microorganismo, sino que podría estar formada por un universo de trypanosomas, cada uno de los parásitos representa una clona con un comportamiento distinto. Sobre esta última suposición algunos investigadores han trabajado aislando diferentes cepas sudamericanas. En esta parte del continente americano se sabe que a pesar de que *T. cruzi* se transmite principalmente a través de triatomíneos, hay menos especies de insectos transmisores que en otros países como México donde se sabe que existen 32 especies. Cada uno origina diferente microambiente para el parásito, el cual podría seleccionar la presencia de diferentes clones de *T. cruzi*. No obstante estos conocimientos y sabiendo que en México se han aislado varias cepas presentando comportamientos muy variados, no se han realizado clonaciones de aquellas, ni se sabe si esta variabilidad de comportamiento esté relacionada con la infectividad

del parásito y su virulencia. El objetivo de este trabajo fue investigar si en México se encuentran cepas multiclonales o monoclonales de *T. cruzi* mediante comparación de los patrones de infectividad y virulencia tanto *in vivo* como *in vitro* determinados para cada una de las clonas utilizando un análisis de varianza ANOVA con las pruebas de F de Fisher y de Tukey, y por comparación de patrones antigénicos y moleculares los cuales se trataron de asociar con los patrones de infectividad y virulencia.

Se clonaron seis cepas de *T. cruzi* aisladas a partir de tres diferentes especies de triatomíneos colectados en diferentes regiones de México mediante el método de la microgota de Miles (Miles, 1975). De las seis cepas sólo una, denominada T5, mostró variabilidad clonal intracepa. Se obtuvieron 11 clonas y se demostró variabilidad clonal por su comportamiento en ratones Balb/c y en cultivos de células Vero. Las subclonas derivadas de las clonas obtenidas ya no mostraron variabilidad intersubclonal. Después de un año de mantenimiento *in vivo* e *in vitro* las clonas mostraron estabilidad en su comportamiento; incluso en cultivo axénico disminuyeron su virulencia e infectividad y otras se eliminaron.

A nivel antigénico no se presentaron diferencias en los patrones electroforéticos entre las cepas y las clonas de la cepa T5. A nivel de ADN mediante la técnica de RAPD se pudieron observar diferencias interclonales; sin embargo las asociaciones entre variables biológicas y moleculares mediante la prueba estadística de Mantel-Haenszel indicó baja correlación.

Los resultados demuestran que no siempre las cepas son multiclonales, y que en éstas, algunas de las clonas se estabilizan en su comportamiento. Se propone que el comportamiento de la cepa es el resultado de la mezcla de las clonas que la conforman. La variabilidad en el comportamiento de una cepa depende de la cantidad de clonas que la integran y del ambiente donde se encuentran.

ABSTRACT

Chagas disease is caused by the hemoflagellate protozoan *Trypanosoma cruzi*. During infection it has a variable clinical outcome, ranging from the absence of symptoms to severe chronic phase characterized by cardiovascular and/or gastrointestinal involvement or even death (Brener, 1987; Prata, 2001). The exact causes of this variable clinical presentation are not known. However, both human and parasite factors are involved. In terms of the parasite, strains of *T. cruzi* show different biological behavior, infectivity and virulence, genetic characteristics, and tropism at different tissues (Engel et al., 1982; Andrade et al., 1999; Buscaglia and Di Noia, 2003; Macedo et al., 2004). In this sense, there are several questions: How many different types of *T. cruzi* strains exist in nature? Can a strain change its behavior along time? Or is it stable in any environment. Can changes in its behavior be at cellular level? It has been reported that changes are observed when strains pass through different environments. This is because they suffer changes at genetic and biochemical level in the cytoplasm that affect its metabolism. Another explanation is that a strain is composed by a constellation of tripanosomes; each one, named clones, has different behavior. About the last hypothesis, several researchers have worked isolating tripanosomes derived from a strain, only from Southamerica where *T. cruzi* is transmitted by triatomines in the majority of cases. It is important to mention that there are 31 species in Mexico, all of them able to transmit *T. cruzi*. If each triatomine has different microhabit for *T. cruzi*, they can select the clones. Although in Mexico it has been isolated many strains of *T. cruzi* have been isolated,, they have not been cloned so far. Do not know if the variability of their behavior is associated with infectivity and virulence of the parasite. The purpose of this work was to investigate if *T. cruzi* strains isolated from Mexico are multi- or monoclonals by determination of variability in virulence and infectivity using analysis of variance ANOVA with Fisher, and Tukey tests, as well as determination of molecular and antigenic patterns in order to know if all of the parameters are associated among them.

At the antigenic level we did not observe any differences in the electrophoretic patterns between the parental T5 strain and the clones, and among them. At the DNA level by RAPD we could see interclonal differences, but not at all with Southern-blot; however, associations between biologic and molecular parameters showed low correlation by Mantel-Haenszel test.

INTRODUCCIÓN

La enfermedad de Chagas, causada por el protozooario hemoflagelado *Trypanosoma cruzi*, presenta un extenso rango de manifestaciones clínicas que varían desde la ausencia de sintomatología hasta un cuadro clínico crónico y severo caracterizado por complicaciones cardiovasculares y/o gastrointestinales, e inclusive la muerte (Brener, 1987; Prata, 2001). Las causas exactas de esta variabilidad clínica aún no se han dilucidado, sin embargo están involucrados factores relacionados con el huésped y el parásito (Postan, y cols., 1987). Con respecto al primero, factores genéticos involucrados con su susceptibilidad a la infección, capacidad de generar una respuesta inmune, factores nutricionales y condiciones ambientales que favorecen la infección, entre otros pueden, de alguna manera, aumentar o disminuir la probabilidad de infección (Andrade, y cols., 2002).

Desde el punto de vista del parásito, se han aislado muchas cepas de *T. cruzi* a lo largo del continente americano y se ha demostrado que cada una se comporta de distinta manera. Factores ambientales pueden ejercer influencia sobre el metabolismo del parásito, a su vez la síntesis de nuevas moléculas dentro del parásito influyen en su adaptación y desarrollo los cuales repercuten a nivel genético. Por otro lado, algunos estudios con cepas sudamericanas han demostrado que éstas pueden estar constituidas por clonas del parásito y que cada clona presenta distinto comportamiento biológico, virulencia, características genéticas, y tropismo a diferentes tejidos (Dvorak, 1984; Engel y cols., 1982; Andrade, y cols., 1999; Buscaglia y Di Noia, 2003; Macedo y cols., 2004). De aquí que se ha propuesto que una infección por las diferentes clonas conduce a variaciones en el cuadro clínico (Macedo, y Pena, 1998; Macedo y cols., 2004). Así mismo se ha propuesto que las diferentes clonas están dispersas a lo largo del continente americano (Tibayrenc y Brenier, 1988). En México la enfermedad de Chagas es uno de los principales problemas de salud, se ha estimado que 1.6 millones de habitantes están infectados y

de estos 155 000 son niños (Guzmán, 2001; Velasco et al., 1992). También en México se ha visto esta variabilidad clínica, además de que es un país donde se presenta la mayor variabilidad de especies de insectos reducidos denominados triatomíneos que son transmisores de *T. cruzi*. Hay 32 especies registradas, cada una con diferente capacidad de transmisión (Zarate y Zarate, 1985; Vidal y cols., 2002, Galvao, 2003).

Las cepas de *T. cruzi* que se han aislado en México muestran diferente comportamiento, varían en su capacidad de virulencia y en su comportamiento en ambientes acelulares. Esto último ha sido demostrado en ratones de experimentación y en medios de cultivo, respectivamente (Cárdenas y cols., 1975; Salazar y cols., 1978; Espinoza y cols., 1998; López-Olmos y cols., 1998). Algunas cepas se conservan cuando son mantenidas en el laboratorio pero otras no son tan estables y se eliminan. ¿Cuáles son las razones que explican dicha variabilidad en el comportamiento? De acuerdo a los resultados en estudios de cepas sudamericanas, las cepas pueden estar compuestas por innumerables clonas que se van seleccionando de manera que la composición clonal de cada cepa varía con el tiempo dando un resultado variable. En México no se han clonado cepas de *T. cruzi* ni se ha demostrado si este supuesto explica la variabilidad observada, ni que tan estables son las clonas a través del tiempo, y por otro lado si las variables de infectividad y virulencia están relacionadas, y más aún se asocian a un patrón genético o es meramente ambiental. Para contestar dichas interrogantes y comprender mejor la variabilidad clínica de la enfermedad de Chagas en este trabajo fue necesario clonar cepas aisladas en México y determinar su virulencia e infectividad en ratones y cultivos celulares y determinar su estabilidad a través del tiempo.

ANTECEDENTES HISTÓRICOS

1. Historia de enfermedad de Chagas

En el año de 1909 el Dr. Carlos Ribeiro Justiniano das Chagas publica los hallazgos que él mismo demostró sobre su experiencia desde 1907 que lo condujo al descubrimiento de la enfermedad que lleva su nombre (Chagas, 1909).



Fig.1 Fotografía del Dr. Oswaldo Cruz (izquierda), del Dr. Carlos Chagas (derecha).

En su publicación escrita en portugués y alemán, él señala los hallazgos que observó durante la expedición sobre la campaña antipalúdica en Minas Gerais en Brasil, dirigida por el Dr. Oswaldo Goncalvez Cruz. Chagas reportó que las viviendas de la gente que visitó tenían en el interior chinches hematófagas denominadas “barbeiros” en gran cantidad. Que constantemente les picaban, sobre todo en las noches. Al enviarle ejemplares de estos insectos al Dr. Oswaldo Cruz, encontraron protozoarios flagelados que pertenecen a la especie *Trypanosoma cruzi*, y que en ese entonces se le denominó *Schizotrypanum cruzi*. Se infectaron varios animales como cobayos, y monos de la especie *Callithrix penicillata*. Después de 20 a 30 días se encontraron

trypanosomas en su sangre. Posteriormente, Chagas siguió con la investigación y examinó a la gente de esas viviendas, de entre ellos dos niños, una de 2 años llamada Berenice que presentaba un cuadro agudo se observó a *T. cruzi* en su sangre, al igual que otro niño, José de 8 años. Igualmente encontró parásitos en sangre de animales, como el gato. Con la sangre de los niños infectó nuevamente cobayos y macacos y éstos desarrollaron la parasitemia. Así mismo los barbeiros libres de infección se alimentaron de los macacos y en los insectos se desarrollaron trypanosomas. Todo esto demostraba el ciclo biológico de *T. cruzi*, solo que Chagas pensó que la transmisión era por picadura; Sin embargo, Brumpt en 1914 descubrió que la transmisión era por las deyecciones y no por la picadura. Desde entonces, se empezaron a reportar casos de la Enfermedad de Chagas en diferentes países como son el Salvador (1914), Venezuela (1919), Perú y Paraguay (1920), Panamá (1931), Chile (1939), México (1940) por Luis Mazzotti procedentes del estado de Oaxaca. En 1919 se descubre a *Rhodnius prolixus* como otro transmisor, después que el primero fue *Panstrongylis megistus*. En 1935 se describe el signo de Romaña-Mazza (Chagas, 1909; Brump, 1914; Velasco y cols., 1991).

2. Enfermedad de Chagas en México

A los transmisores se les conoce con el nombre de triatominos. Los primeros datos que señalan la existencia de triatominos en México datan de 1528 en que Antonio de Herrera hace una reseña de los viajes de Francisco de Garay al Pánuco, en Veracruz y señala que él fue víctima de piquetes de mosquitos y pitos, que suelen causar calenturas, (hay regiones donde a los triatominos se les llama “pitos”). Por esos años Fray Bernardino de Sahagún señala la existencia de triatominos, aunque en esa época no se conocían como tales, su descripción hace pensar que se trata de ellos (Velasco y cols., 1991; Sahagún, 1956). En 1891 Latreille describe la presencia de *Triatoma dimidiata* en Centroamérica y México (Velasco y cols. 1991). A finales de la década de 1920 Hoffman reporta la presencia de triatominos en Veracruz como posible transmisor de *T. cruzi* (Hoffman, 1928). Alrededor de 1940, además del reporte de los primeros dos casos de

Chagas humano por L. Mazzotti, también él reporta la existencia de *Rhodnius prolixus* (Mazzotti, 1940). En 1947 Aguirre-Pequeño reporta la presencia de un tlacuache infectado con *T. cruzi* en Nuevo León (Aguirre, 1947). En 1949 Perrín presenta la publicación sobre miocardiopatía chagásica experimental (Velasco, 1991). En la década de 1950 y 1960 se realizan estudios epidemiológicos en diferentes estados de la República. Durante los años 70's y 80's se han realizado investigaciones sobre encuestas seroepidemiológicas en diferentes partes del país. En los últimos 25 años se han realizado estudios experimentales con relación a la caracterización de las cepas de *T. cruzi*, sobre todo sus aspectos de virulencia y características bioquímicas y moleculares.

3. Estudios sobre cepas de *T. cruzi*

A principios del siglo XX y durante sus primeras cuatro décadas se detectaron casos de infección humana en diferentes países; así mismo se describió el signo de Romana y se identificaron diferentes reservorios de *T. cruzi*. Sin embargo, faltaba conocer más acerca del agente causal. En la segunda mitad del siglo se realizaron estudios sobre el aislamiento del protozooario y se le acuñó “cepa” a los microorganismos en diferentes momentos y a partir de diferentes huéspedes pudiendo ser el ser humano, algún animal reservorio o un triatomo. Desde entonces, en México se han caracterizado las cepas de *T. cruzi*. En 1969, Tay y cols. (Tay y cols., 1969), demostraron que una cepa puede comportarse de distinta manera si está parasitando diferentes especies de triatominos, de igual manera su comportamiento es diferente si permanece haciéndose pases en ratón de la misma cepa. En otro trabajo Tay y cols. (Tay, y cols., 1973) en 1973 y 1975 reportan el comportamiento de seis cepas de *T. cruzi* aisladas de diferentes huéspedes y de diferentes partes de la República Mexicana, en donde se observa que cada una presenta distinto comportamiento en la misma cepa de ratones infectados (Cárdenas, y cols., 1975). En 1979, Salazar y colaboradores reportaron el comportamiento en ratón de otras cuatro cepas aisladas en Jalisco donde cada una presenta distinta virulencia (Salazar y cols., 1978).

Siguiendo con la caracterización de las cepas, Tay y colaboradores describieron las características morfológicas de una cepa de *T. cruzi* en el interior de los triatominos, en cultivo NNN y en ratones (Tay y cols., 1980). La caracterización de las cepas mexicanas de *T. cruzi* tomó un giro distinto cuando se caracterizaron por isoenzimas, en 1992 mediante estudios de su kDNA, en que 17 cepas denominadas Stocks se analizaron y caracterizaron por RFLP (restriction fragment length polymorphisms) asociados con espaciadores genéticos de RNA. En este trabajo se demuestra la variabilidad entre los diferentes stocks estudiados provenientes de distintos huéspedes y estados del país, sugiriendo esta metodología para caracterizar las cepas enfocándola hacia una aplicación epidemiológica (Zavala-Castro y cols., 1992). En 1998 López-Olmos y colaboradores demostraron que estos 17 stocks también presentan heterogeneidad en su comportamiento pero distinta agrupación de los reportados por Zavala y colaboradores (1992) y se demuestra variabilidad en cuanto a la infectividad de los stocks en cultivos celulares y mediante análisis isoenzimáticos (López-Olmos y cols., 1998).

Los sistemas biológicos involucrados en virulencia, los bioquímicos y los genéticos aparentemente no tienen relación (Brenier y cols., 1989). Sin embargo Espinoza y colaboradores en 1998 demostraron correlación entre análisis de RFLP con genes espaciadores de RNA para agrupar las cepas y patrones de virulencia en ratón para diferentes cinco cepas estudiadas (Espinoza y cols., 1998). Para el año 2001 se confirma la heterogeneidad de las cepas de *T. cruzi* mediante análisis por Southern-blot, además de que el parásito tiene una estructura de población clonal (Hernández y cols., 2001). Todos estos estudios sugieren que todavía falta mucho por saber acerca de la caracterización de las cepas de *T. cruzi* aisladas en México.

En cuanto a la caracterización de las cepas de *T. cruzi* en otras partes del mundo, desde el momento de su descubrimiento Carlos Chagas hace una caracterización morfológica (Chagas, 1909) señalando que el parásito presenta, no una, sino varias formas en el insecto transmisor, distintas a la presente en la sangre del huésped vertebrado. Desde el punto de vista morfológico,

en 1973 Brener describe dos tipos de tripomastigotes, los delgados y los gruesos (Brener, 1973). Otro tipo de caracterización fue realizándose con el tiempo. Nussenzweig y colaboradores en 1963 describen diferencias inmunológicas entre las cepas que estudiaron y demostraron que las cepas se pueden formar en tres grupos de acuerdo a su reacción cruzada con sueros heterólogos (Nussenzweig y cols., 1963; Nussenzweig y Goble, 1966). La electroforesis enzimática (zymodemos) también fue una herramienta que con fines epidemiológicos pudo agrupar a las cepas en aquellas de ciclo doméstico (Z2) y de ciclo selvático (Z1, Z3) (Miles, y cols., 1977; Miles, y cols., 1978). En 1982, Romanha demuestra que hay más de tres diferentes zimodemos: Z1, Z2 o ZA, Z3, ZB, ZC y ZD (Romanha, 1982). Tibayrenc y Ayala en 1988 demuestran heterogeneidad entre 645 cepas de *T. cruzi* con 15 loci, examinados isoenzimáticamente e identificando al menos 43 diferentes cepas separadas isoenzimáticamente llamados clonets proponiendo una estructura de población clonal con reproducción sexual rara o ausente (Zhang y cols., 1988). Se ha demostrado el predominio de ciertas clonas en diferentes regiones (Breniere y cols., 1998). La caracterización de esquizodemos mediante análisis de RFLP fue descrita y ensayada por Morel en 1980 encontrando alta heterogeneidad (Morel y cols., 1980). En 1993 Steindel y colaboradores proponen emplear la metodología de RAPD (randomly amplified polymorphic DNA), para estudiar la variabilidad y se encontró correlación con el análisis isoenzimático (Steindel, 1993; Tibayrenc y cols., 1993; Tibayrenc y cols., 1995). Se ha propuesto que existen dos subgrupos de *T. cruzi* y que las cepas se ubican en estos dos linajes I y II, analizando su divergencia genética mediante diversas pruebas (Souto y cols., 1996; Nunes y cols., 1997). Además se encuentra que en las cepas de *T. cruzi* aisladas en México predomina un linaje tipo I (Bosseno y cols., 2002). Todos estos estudios han caracterizado las cepas de *T. cruzi* indicando que hay cepas de ciclo doméstico y selvático, algunos han tratado de correlacionar con datos clínicos de la enfermedad de Chagas pero aún no hay nada concluyente y universal (Apt y

cols., 1987). Por tanto ese es el punto que falta para poder predecir y tratar la enfermedad de Chagas en un individuo infectado con *T. cruzi* (Buscaglia y Di Noia, 2003).

A nivel de virulencia e infectividad, la variabilidad de cepas de *T. cruzi* aisladas en regiones diferentes a las de México se ha demostrado principalmente en ratones (Watkins 1966) por ejemplo midiendo el nivel de histotropismo en ratones (Melo y Brener, 1978). Bice and Zeledón en 1970 compararon la infectividad de cinco cepas de *T. cruzi* en ratones C3H demostrando variabilidad en el comportamiento de cada una a nivel de parasitemia e histotropismo (Bice y Zeledón, 1970).

4. Estudios sobre clonas de *T. cruzi*

Los estudios sobre variabilidad en el comportamiento de las cepas de *T. cruzi* permitieron reflexionar desde qué nivel existe una variación en las poblaciones de *T. cruzi* (Lambrecht, 1965; Dvorak, 1984). En 1975, Miles logra separar los parásitos individualmente y colocar solo uno en un medio en el cual dió origen a una población, concepto denominado “clona” (Miles, 1975). A la fecha y desde entonces se han innovado otras técnicas de clonación (Gomes y cols., 1991). Estas metodologías han permitido realizar estudios sobre las diferencias biológicas, bioquímicas y moleculares de las clonas que componen una cepa de *T. cruzi*, (Chia-Tung Pan, 1982; Engel y cols., 1982; Lima y cols., 1990), (Doyle y cols., 1984), (Goldberg y Pereira, 1983), y han contribuido para comprender mejor la relación huésped-parásito en animales de experimentación, en el ratón y en triatomíneos. (Garzon y cols., 2005; Postan y cols., 1983)

5. Estudios sobre triatomíneos

Posiblemente la primera persona en describir la existencia de triatomíneos como hematófagos y su hábitat fue Fray Reginaldo de Lizarraga refiriéndose a *Triatoma infestans* en 1590, en contrados en conventos de Perú a Chile. Sin embargo, él no los pudo clasificar y aún queda la duda. El primer triatomíneo fue descrito en 1773 por De Geer y se le llamó *Cimex rubrofasciatus*, aunque ya entre 1832 y 1833 Laporte en Ecuador lo ubicó en el género *Triatoma* (Velasco, 1992). Para

1811, Latreille identificó a dos especies: *Reduvius dimidiatus* y *Reduvius geniculatus*. En 1834 Kluh identificó a *Reduvius infestans*. Para 1835 Burmeister describe los hábitos hematófagos de las chinches y describe a *Conorhinus megistus* en Brasil y *Conorhinus phyllosoma* en México. En los siguientes 20 años se describen otras especies en países como Uruguay, Guyana Inglesa y Estados Unidos. Entre 1859 y 1872, se describen otras 15 especies de triatominos. Para 1907 ya se conocían 59 especies de triatominos en Triatominae, actualmente se acepta la existencia de 32 especies de triatominos en México y 112 en todo el mundo (Galvao, 2003; Vidal y cols., 2000).

ASPECTOS GENERALES

1. *Trypanosoma cruzi*

El agente causal de la enfermedad de Chagas es el protozoo hemoflagelado *Trypanosoma cruzi*. Se clasifica de la siguiente manera (Levine y cols., 1980):

Reino: Protista

Subreino: protozoa

Phylum: Sarcomastigophora

Subphylum: Mastigophora

Clase: Zoomastigina

Orden: Kinetoplastida

Familia: Trypanosomatidae

Género: *Trypanosoma*

Especie: *Trypanosoma cruzi*

Este protozoo presenta diferentes fases durante su desarrollo, se ha demostrado hasta cinco fases, se denominan: amastigote, epimastigote, tripomastigote, choanomastigote, estafilomastigote. Las tres fases que más se reconocen por su estabilidad y relevancia en su ciclo

biológico son el tripomastigote, epimastigote y amastigote. En la figura 2 se observa un dibujo esquemático de la fase de epimastigote que muestra las estructuras más importantes que se observan bajo el microscopio electrónico.

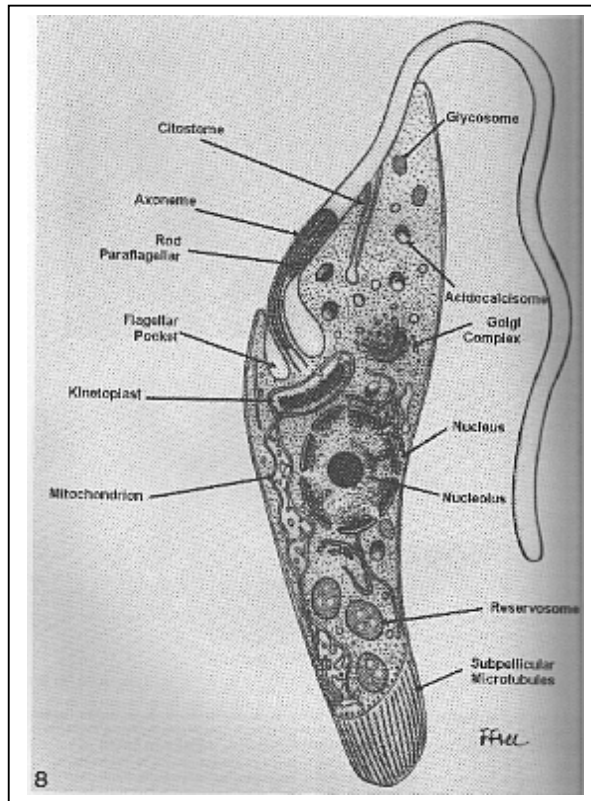


Fig. 2 Dibujo esquemático de la morfología de un epimastigote de *Trypanosoma cruzi* en que se observan las estructuras subcelulares del parásito. (Tomado de De Souza W. 1999. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 94:17-36).

Su superficie celular está compuesta de tres capas: glicocalix, bicapa lipídica y microtúbulos subpelliculares. La primera está compuesta de glicoconjugados y tiene lectinas que pueden funcionar como receptores; está uniformemente distribuida y es delgada en amastigotes y epimastigotes y más gruesa en tripomastigotes. La bicapa lipídica está compuesta de proteínas intramembranales que están uniformemente distribuidas, están presentes en estructuras especializadas como el citostoma en el epimastigote y amastigote. El citoesqueleto es una capa de microtubulos que se encuentran por debajo de la membrana plasmática y pueden conectarse a la

membrana plasmática.

2. Ciclo biológico de *T. cruzi*

Inicia cuando el triatomino no infectado se alimenta de la sangre de un mamífero infectado con *T. cruzi* el cual porta tripomastigotes sanguíneos circulantes (ver figura 3); los tripomastigotes pasan hacia el intestino del triatomino donde se transforman en epimastigotes; éstos se multiplican por fisión binaria y aproximadamente en 10 días se transforman en tripomastigotes metacíclicos en la porción distal del intestino (Brener, 1973).

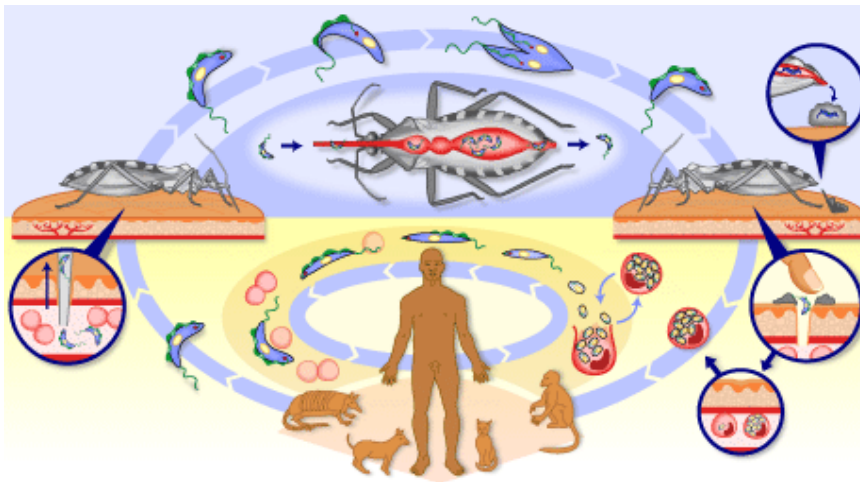


Fig. 3. Ciclo biológico de *T. cruzi*. Esquema general de la transmisión de *T. cruzi* y su paso a través del huésped invertebrado (triatomino) y diferentes vertebrados.

Cuando el vector se alimenta y defeca sobre la piel o mucosa del humano o mamífero deposita las heces junto con los tripomastigotes metacíclicos infectantes; éstos se introducen a las células del tejido del huésped vertebrado cercano al sitio de penetración y aquí se transforman en amastigotes, los cuales se multiplican por fisión binaria, de aquí nuevamente infectan otras células para su división y volver a transformarse en tripomastigotes sanguíneos, y el ciclo finaliza cuando un triatomino se alimenta y adquiere al parásito (Burleigh y Andrews, 1995; Zingales y Colli, 1985). Aunque son menos frecuentes, existen otras vías de transmisión, como

son la transfusión sanguínea con sangre infectada, trasplante de órganos, ingestión de comida contaminada con el parásito, accidentes en el laboratorio por inoculación directa, también transmisión connatal que abarca en el momento del parto y a través de la lactancia materna. La patogenia de esta enfermedad no se ha establecido con certeza, pero actualmente se han propuesto tres teorías principales; la primera se refiere a un daño directo, que se debe a la lesión que produce el parásito al invadir las células del huésped desencadenando un proceso inflamatorio localizado, ya que al provocar la invasión, replicación y muerte de las células infectadas ocasionan liberación de los parásitos y reinfección de otras células produciendo microfibrosis como daño irreversible en los órganos afectados, en particular corazón, esófago y colón. La segunda teoría remite a la afección autoinmunitaria, ya que se han descrito anticuerpos circulantes en pacientes chagásicos crónicos, que reaccionan contra proteínas de tejido conectivo, endocardio y proteínas de músculo estriado, entre otras; lo que ocasiona reconocimiento de las partículas proteínicas tanto propias como extrañas y activación de un proceso inmunológico humoral y celular en contra de los órganos del huésped. Por último la teoría neurógena, asume que el daño del parásito se observa principalmente en las células del sistema parasimpático que inerva los órganos afectados; esto tiene como consecuencia una estimulación simpática excesiva, que a través de los años causa lesión irreversible por sobrecarga de trabajo (Becerril, 2008).

3. Triatominos

Son insectos hematófagos que se clasifican de la siguiente manera:

Tribus	Géneros	no. de especies
• Alberproseniini	<i>Alberprosenia</i>	(2)
• Bolboderini	<i>Belminus</i>	(4)
	<i>Bolbodera</i>	(1)
	<i>Microtriatoma</i>	(2)

	<i>Parabelminus</i>	(2)
• Cavernicolini	<i>Cavernicola</i>	(2)
• Rodniini	<i>Psammolestes</i>	(3)
• Triatomini	<i>Dipetalogaster</i>	(1)
	<i>Eratyrus</i>	(2)
	<i>Linchosteus</i>	(5)
	<i>Panstrongylus</i>	(13)
	<i>Paratriatoma</i>	(1)
	<i>Triatoma</i>	(68)

Los triatominos están ubicados dentro de la subfamilia Reduviidae y en el orden Hemíptera, en el género *Triatoma* se encuentran aquellos cuya probóscide está dividida en tres segmentos de aquí su nombre (Lent y Wigodzynsky, 1979). En el nuevo mundo hay 105 especies y en el viejo mundo 13 especies en las cuales no se ha encontrado *T. cruzi*. Los triatominos pasan por las fases de huevo, cinco etapas larvarias denominadas ninfas y la adulta que puede ser hembra o macho (Schmidt y Roberts, 2000). Son hemimetábolos, es decir, todas las fases ninfales son idénticas morfológicamente, pero distintas a la fase adulta. Los huevos son operculados y presentan una cubierta llamada exocorion cuya morfología geométrica sirve para caracterizarlos (Barata, 1981). Al momento de la oviposición son de colores claros, y con el tiempo cambian y se hacen rosados. La oviposición ocurre a los 10 a 20 días después de la cópula. Generalmente los primeros huevos no están fecundados y después ovipone los huevos fecundados, éstos pueden retener el esperma durante tiempos prolongados. Cada hembra ovipone entre 300 y 600 huevos durante su vida en un periodo de 3 a 12 meses, dependiendo de la especie y de la cantidad de sangre ingerida. Los huevos eclosionan entre 10 y 40 días, dependiendo de la especie, humedad y temperatura.

Las ninfas recién eclosionadas son blandas y de colores claros, pero en 2 a 3 días su cutícula se endurece y oscurece y está lista para alimentarse. Se alimentan de los mismos huéspedes que las fases adultas. Basta con una alimentación para poder mudar a la siguiente fase. Para mudar tardan entre 15 y 45 días. Una alimentación hasta repletarse facilita el efecto de mudar. En cada alimentación tardan 10 a 30 minutos aunque puede variar para cada especie. Para distinguir entre los diferentes estadios ninfales hay pocos caracteres morfológicos que permiten hacer la diferenciación, casi siempre se basan en el ancho de las patas y la estructura cefálica (Lent y Wygodzinsky, 1979). El último estadio ninfal se distingue de los otros estadios ninfales por la presencia de alas incipientes. Los adultos tienen la mitad del ala membranosa lo que les permite vuelos cortos. Su ciclo de vida tarda entre 3-4 meses o hasta 1-2 años dependiendo de la especie. En el ciclo natural las chinches son de hábitos nocturnos, es decir se alimentan picando a su huésped durante la noche. Los factores a corta distancia que atraen a los triatominos para picar a su huésped son la temperatura y la presencia de CO₂. La saliva del triatomo ocasiona vasodilatación, inhibe la hemostasis y tiene propiedades anticoagulantes. Cuando pican se estimula diuresis por lo que los insectos evacúan y siguen comiendo, eliminan el agua en exceso de la sangre que están ingiriendo. Esto varía en tiempo y cantidad dependiendo de la especie. El huésped reacciona a la picadura de diferente manera, generalmente con un eritema local y prurito, pero en otras ocasiones se produce una pápula eritematosa y urticaria. Las especies selváticas producen mayores reacciones que las domésticas por lo que favorece la picadura en éstas, inclusive son indoloras por sustancias anestésicas que inoculan al inicio de su alimentación (Schofield y cols., 1999).

4. Cuadro clínico

El cuadro clínico de una enfermedad está dado por las manifestaciones que presenta un paciente, en este caso infectado con *T. cruzi*, o sea qué tipo de signos y síntomas presenta. Desde luego

que es necesario explicar dicha sintomatología de acuerdo a los mecanismos de agresión que presente el parásito, es decir la patogenia de la enfermedad.

a. Patogenia

Una vez que el parásito penetra las células circundantes al sitio de la infección, y completa uno o varios ciclos de replicación intracelular, pasa al torrente sanguíneo en donde puede alcanzar diversas células del huésped, como las del bazo, hígado, y sobre todo músculo cardiaco. También puede establecer un primer contacto con los macrófagos y ser fagocitado. *T. cruzi* evade este primer contacto con la respuesta inmunitaria, escapa de la vacuola fagocítica y se replica en el citoplasma de los macrófagos (Zingales, 1985).

La resistencia a la infección por parte del huésped puede ser de varios tipos. La respuesta celular está mediada por macrófagos activados y por neutrófilos y eosinófilos a través de anticuerpos (Brenner 1980). La reacción humoral incluye la lisis del parásito a través de la activación de la vía clásica de la cascada del complemento mediada por inmunoglobulinas del tipo IgG. Sin embargo, la fase de tripomastigote del parásito presenta un sistema enzimático membranal capaz de contrarrestar esta respuesta e inhibir la convertasa de C_3 si no se satura (Zingales, 1985). Se han descrito factores de resistencia a la infección propios del huésped, como son los niveles séricos de hierro, que pueden tener implicaciones en la virulencia de las cepas, y la presencia de lipoproteínas de alta densidad, que pueden interferir con el proceso de infección (Prioli y cols., 1991).

b. Manifestaciones clínicas

Los síntomas de la enfermedad de Chagas pueden variar en su gravedad según sea la zona geográfica, lo que hace pensar que existen diferencias en la virulencia de las cepas circulantes e incluso en la resistencia natural a la enfermedad que pudiera existir en algunas poblaciones. La “enfermedad de Chagas” se divide en tres fases (Prata, 2001):

Fase aguda. Este periodo se presenta en forma más virulenta en niños menores de seis años, en los cuales puede causar la muerte debido a alteraciones del SNC, como meningoencefalitis, letal en el 50% de los casos, y trastornos cardiacos como miocarditis (Rassi 1979). Por lo general, el periodo de incubación toma tres a 10 días y se pueden encontrar parásitos en la circulación sanguínea en un lapso de 4 a 6 meses luego de la infección, siendo la parasitemia más intensa durante el primer mes. Durante este periodo, los parásitos se replican intensamente en células epiteliales, macrófagos y fibroblastos. Se pueden presentar algunos signos, denominados en conjunto “puerta de entrada”, como son el chagoma de inoculación, caracterizado por la presencia de un proceso inflamatorio agudo localizado en el sitio de infección, y que produce una induración dolorosa y eritematosa o un edema unilateral bpalpebral con adenitis retroauricular que se conoce como signo de Romaña, y que aparece cuando la infección tiene lugar por la conjuntiva ocular. Ambos signos son autolimitados y desaparecen con lentitud al cabo de 30 a 60 días (Becerril, 2008). La diseminación de los parásitos puede ocurrir por las vías: linfática y hemática. En la primera se puede observar un compromiso ganglionar de consideración, con endurecimiento de los ganglios periféricos cercanos al sitio de infección, y el paciente refiere dolor al tacto. Es posible identificar parásitos en su forma de amastigote en el interior de las células ganglionares. También se presenta malestar general, fiebre continua o intermitente, linfadenitis generalizada, dolores musculares, escalofrío, hepatoesplenomegalia y esplenomegalia, además de que el individuo describe astenia y adinamia, lo que ocasiona una sensación de cansancio progresivo debido al daño cardiaco que desde esta fase comienza a presentarse. Igualmente se ha informado un incremento de los niveles de globulinas séricas y una disminución de los de albúmina; asimismo, pueden encontrarse alteraciones electrocardiográficas, en especial arritmias y taquicardias, e incluso miocarditis, que pueden ser fatales (Becerril, 2008). En algunas regiones de América Latina se han notificado parasitemias graves en niños pequeños con presencia de hepatoesplenomegalia, fiebre elevada,

anasarca y aun afección del SNC (meningoencefalitis), que puede causar la muerte del paciente. Muchas veces no se establece un diagnóstico adecuado, sobre todo por la facilidad con la que se confunden los signos y síntomas de la enfermedad de Chagas con otros padecimientos comunes de los países afectados; esto hace de vital importancia obtener un historial clínico en el que pueda establecerse un diagnóstico diferencial. Los individuos en fase aguda pueden evolucionar a la fase crónica, pasar por las fases subclínica o indeterminada o curarse sin tratamiento. Los factores que determinan la evolución de la enfermedad no se han dilucidado hasta el momento.

Fase subclínica (indeterminada). Es una fase silenciosa que puede extenderse hasta 20 años antes de presentar el daño característico de la fase crónica; en este lapso pueden manifestarse alteraciones electrocardiográficas aisladas (en particular arritmias y taquicardias), y en algunos casos puede ocurrir muerte súbita sin causa aparente si no se establece un diagnóstico oportuno de la enfermedad. La presencia de parásitos circulantes es rara. Generalmente se detecta accidentalmente, es decir, el paciente se detecta cuando presenta otro padecimiento y al realizarse una prueba de diagnóstico resulta positivo; o bien, cuando se realiza una investigación intencional sobre enfermedad de Chagas en una comunidad y se encuentra gente seropositiva a *T. cruzi*.

Fase crónica. Después de 15 a 20 años, y en algunos países hasta más tiempo, se llegan a manifestarse signos y síntomas de la enfermedad en fase crónica (Amorín, 1979). En este periodo existen alteraciones en corazón y músculo liso, sobre todo esófago y colon. Se ha estimado que un 30% de las personas infectadas desarrolla la fase crónica, de estas la mayor parte desarrolla cardiopatía crónica (27%) y alteraciones crónicas digestivas y neurológicas (6 y 3%, respectivamente). La afección cardíaca se manifiesta como alteraciones de la conducción, las cuales propician bloqueos completos o incompletos de alguna de las ramas del haz de His (en especial la derecha), en ocasiones con bloqueos completos del nodo auriculoventricular. El crecimiento ventricular es común, aunque también se puede observar un crecimiento auricular.

La afección cardíaca también puede incluir valvulopatías, la más común de las cuales es la estenosis mitral. Las arritmias son expresiones usuales en estos pacientes. El corazón sufre una dilatación progresiva que lleva a una cardiomegalia visible en radiografía (índice cardiotorácico > 0.50) y en ECG. Se reconocen alteraciones del complejo QRS y las ondas P y T (De Michelli, 1993).

5. Caracterización de *T. cruzi*

Debido a que la enfermedad de Chagas cursa por fases asintomáticas y con sintomatología en personas infectadas, además de que la variabilidad clínica de la infección sintomática es muy grande, es importante explicar las razones desde el punto de vista del parásito. Conforme se han caracterizado diferentes cepas de *T. cruzi* se ha demostrado que hay un sin número de ellas en la naturaleza. Entendiéndose como cepa a una población de un microorganismo con ciertas características bien definidas genéticas o biológicas (Thompson y Lymberry, 1990). Cuando una cepa se cambia de un ambiente a otro, el comportamiento de la cepa cambia también, particularmente cuando se trata de estudiar la virulencia de los parásitos. Por ejemplo, a una cepa en medio de cultivo se le puede atenuar su virulencia y conservar en ratones; sin embargo esta virulencia puede aumentar cuando se mantiene dentro de huéspedes vertebrados. Razones que explican esto pueden ser cambios genéticos, estrés del cambio al nuevo ambiente del huésped o inclusive la existencia de conjuntos de clonas que forman una cepa. En este último sentido, cada clona presenta diferentes características en comportamiento, por ejemplo en ratones diferente tropismo tisular o mortalidad a ratones. Para llegar a esta caracterización es necesario realizar diferentes técnicas: el primer paso es el aislamiento, luego la caracterización biológica *in vitro* o *in vivo* y finalmente una caracterización más fina a nivel bioquímico, inmunológico, genético o molecular.

a. Aislamiento de *T. cruzi*

Se puede aislar mediante inoculación en animales de laboratorio, por xenodiagnóstico o crecimiento en medios de cultivo.

- a) Inoculación de animales de experimentación: La muestra inicial puede ser triatomino infectado, muestra de sangre de una persona infectada, o de un reservorio naturalmente infectado. Para el primer caso el triatomo es comprimido de su abdomen de manera que pueda defecar sobre una caja de petri limpia y seca con solución salina isotónica. Se aspira el contenido con una jeringa de 1 mL y se inocula aproximadamente 0.3 mL intraperitonealmente a dos o cinco ratones..
- b) Por xenodiagnóstico: Se colocan en el antebrazo de la persona infectada entre 5 y 10 triatomino dentro de un recipiente tapado pero con zona expuesta y cubierta con tela que permita la picadura del insecto. Después de 20 a 40 minutos de exposición se retiran los triatomino y se dejan mantenidos en el laboratorio durante 20 a 30 días y se observan periódicamente cada tercer o cuarto día sus heces entre porta y cubreobjetos. Si el triatomo resulta positivo se indica que la persona está infectada y posteriormente los parásitos se inoculan animales de laboratorio, medios de cultivo o se mantienen en triatomino.
- c) En medio de cultivo: una muestra de heces de triatomino o sangre de animales capturados en la naturaleza de personas se colocó dentro de tres a cinco tubos con medios de cultivo, pueden ser NNN (Novy, Mc Neal, Nakamura), Nakamura o LIT (Liver infusión tryptose). Se revisan periódicamente y cuando se observan parásitos significa el aislamiento del parásito.

b. Caracterización biológica *in vitro*

Se puede realizar en medio axénico o cultivos celulares. Para el primer caso, los parásitos crecen de acuerdo a una curva de crecimiento típica de microorganismos de manera que

inóculos definidos de parásitos en fase de epimastigotes se inoculan a medio de cultivo LIT (Camargo, 1964) y se incuban a 27°C y mediante conteo en cámara de Neubauer se contabilizan los parásitos presentes colocando una gota en dicha cámara. Previamente, la gota estuvo en contacto con eritrosina al 1% para inmovilizar a los parásitos y contar los parásitos viables. Cada tercer día o diariamente, dependiendo de la velocidad de reproducción, se cuentan los parásitos. Cuando están terminando su fase exponencial de crecimiento se pasan a un nuevo medio; para determinar su curva de crecimiento, se realiza hasta llegar a fase de muerte.

En cultivos celulares, los parásitos en medio D-MEM suplementado con suero fetal bovino al 10%, son inoculados en portaobjetos cubiertos con proteínas como albúmina o gelatina antes de llegar a confluencia. Se incuban a 37°C y periódicamente se observan sobre microscopio invertido (Chia-Tung Pan, 1978; Rodríguez y Marinkelle, 1970). Después de tiempo determinado los portaobjetos se lavan con solución isotónica y se tiñen con colorante Giemsa para observar bajo el microscopio compuesto. Se cuentan las células hospederas de cultivo y los parásitos infectantes para determinar, porcentaje de células infectadas e índice de infección en cada cultivo. El desarrollo de *T. cruzi in vitro* ha sido demostrado en diversos sistemas de cultivos celulares, por ejemplo, celas HeLa, células musculares de embrión bovino (Dvorak y Hyde, 1973).

c. Caracterización biológica *in vivo*

Una muestra de parásitos determinada cuantitativamente se inocula por vía intraperitoneal con jeringa de 1 mL (insulina). Cada tercer o cuarto día se determina la parasitemia. Para ello se corta la punta de la cola del ratón y una gota de sangre se coloca sobre un portaobjetos y entre cubreobjetos se observa bajo el microscopio compuesto. En caso de observar parasitemia se coloca una gota más en un tubo con cloruro de amonio al 0.87% en proporción 1:2 a 1:5 dejando reposar 5 minutos con la finalidad de lisar los glóbulos rojos y permitir

observar los trypanosomas y contarlos con facilidad. Se coloca la muestra en cámara de Neubauer y se cuentan. Así mismo se determina la mortalidad acumulada a través del tiempo. Otro dato importante es el histotropismo. Cuando los ratones mueren o se sacrifican se disecan los órganos a investigar. Se colocan en solución de formol al 15 diluido en PBS. Se procede a realizar el corte histológico y tinción para observar al microscopio la presencia de nidos de amastigotes (Bice y Zeledón, 1970).

d. Caracterización Inmunológica

Los parásitos reproducidos en cualquiera de los sistemas de reproducción, en cultivo o animales de laboratorio, son lavados adecuadamente en PBS hasta quedar libre de impurezas. Se someten a lisis por sonicación, y la suspensión se centrifuga hasta tener un paquete. El sobrenadante contiene las proteínas solubles que pueden ser antigénicas. Se determina su concentración para ajustarlas y someterlas a una electroforesis en gel de poliacrilamida. Se realiza una transferencia de las proteínas a un papel de nitrocelulosa, el cual se bloquea con proteínas como albúmina sérica bovina y luego se adiciona el suero de un huésped infectado con *T. cruzi*. Después de un período de incubación se adiciona un suero anti-huésped (puede ser humano, ratón etc.). Se agrega el sustrato revelador y se deja secar la membrana para detectar las bandas de antígenos e identificar sus pesos moleculares con estándares de peso molecular (comunicación personal).

e. Caracterización molecular

a) Caracterización isoenzimática: Un extracto soluble o crudo proveniente de una suspensión del parásito es evaluado. Se somete a electroforesis y se trata de revelar con el sustrato de una enzima. Debido a que una enzima es una proteína, ésta puede tener distinta movilidad a pesar de que se trate de la misma enzima, se le llama isoenzima y tiene que ver con el locus que codifica para ella, de manera que se detecta homocigotos y heterocigotos (Goldberg y Pereira, 1983).

- b)** Análisis de esquizodemos: Esta técnica se basa en el análisis electroforético de kDNA cortado con enzimas de restricción (RFLP) y observar la movilidad que presentan (Morel et al. 1980). Otro método es el del polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción (Restriction Fragment Length Polimorphism, RFLP). La técnica se basa en la utilización de enzimas de restricción, las cuales reconocen secuencias específicas dentro del DNA. La presencia o ausencia de esas secuencias produce fragmentos de diferentes tamaños, que después se analizan en geles de agarosa (Morel y cols., 1980).
- c)** Los espaciadores del cistrón ribosomal, así como el DNA de microsatélites son otras técnicas utilizadas para este tipo de análisis, ya sea a través de hibridaciones con sondas específicas o por medio de PCR (Fernandes, 1999).
- d)** Análisis de polimorfismos génicos. En muchas ocasiones es importante determinar las relaciones filogenéticas o taxonómicas que presentan ciertos parásitos. El análisis del polimorfismo génico se basa en la comparación de las diferencias que presentan los genomas de los parásitos entre sí o entre especies relacionadas. Entre los métodos más utilizados para este fin está la amplificación al azar del DNA polimórfico (Random Amplification Polimorphic DNA) o en sus siglas en inglés: RAPD, que consiste en amplificar de modo exponencial el DNA genómico, utilizando la técnica de PCR con hexanucleótidos con secuencias arbitrarias (Dias Neto, 1993; Steindel y cols., 1993). Estas secuencias servirán de iniciadores en la reacción de PCR para amplificar fragmentos de DNA al azar, que luego se comparan en un gel de agarosa.
- e)** Transcripción inversa/pcr (RT-PCR). La transcripción inversa es el proceso mediante el cual se genera una molécula de DNA a partir de una de RNA, es decir, lo contrario del proceso básico que ocurre normalmente. El descubrimiento de una enzima codificada en el genoma de un virus, la transcriptasa inversa, dio origen a este método que permite la generación de los bancos de cDNA descritos antes y a otros que se usan en el estudio de

los procesos moleculares. Entre éstos se encuentra la RT-PCR. Esta técnica combina la transcripción inversa con la técnica de reacción en cadena de la polimerasa. Con esta técnica es posible detectar la presencia de cantidades muy pequeñas de la secuencia codificadora de algún gen en particular por medio del empleo de los iniciadores adecuados (Porcel y cols., 2000). Por esta particularidad se utiliza, en algunos casos, como método de diagnóstico de algunas enfermedades; sin embargo, por ser el RNA una molécula muy lábil que puede degradarse con mucha facilidad es necesario contar con espacios adecuados para trabajar, sustancias que inhiban la enzima RNAsa y muchas otras condiciones que sólo permiten la aplicación de la técnica en laboratorios especializados.

6. Importancia en salud pública

La enfermedad de Chagas es una de las infecciones más importantes en salud pública en Latinoamérica. Debido a que el principal mecanismo de transmisión es mediante las deyecciones de los triatomíneos, la parasitosis está relacionada con la existencia de estos insectos, su extensión va desde el sur de Estado Unidos hasta Argentina. De acuerdo a la organización mundial de la salud 16 a 18 millones de personas están infectadas con *T. cruzi* y 100 millones estarían en riesgo de infección lo que representa el 4% de la población total de latinoamerica (WHO, 1991; WHO, 2002). Hay una incidencia de casi 500 000 nuevas infecciones al año en ausencia de medidas de control en un país. Según el Banco Mundial, esta enfermedad ocupa el tercer lugar entre las causas más importantes de discapacidad atribuible a enfermedades parasitarias, después de la malaria y la esquistosomosis; y para Latinoamérica en cuarto lugar después de infecciones respiratorias, diarreas y SIDA. Actualmente se reconoce la existencia de 118 especies de triatomíneos (Schofield, 1994). Las especies de mayor importancia son las que habitan en el interior de las habitaciones (domésticas), sin embargo también son importantes las de ciclo peridoméstico y selvático,

pues pueden penetrar a los domicilios o infectar animales que entran a las habitaciones de la gente. Por otro lado, al ser insectos hematófagos algunas especies pueden causar cuadros de anemia importantes.

Esta parasitosis tiene un fuerte impacto social y económico ya que repercute en el desarrollo del país. Aunque no se ha realizado estimación alguna sobre el ausentismo o la pérdida de productividad laboral debido a la enfermedad de Chagas, el rendimiento manual o mecánico de un individuo en fase crónica se ve comprometido. Se ha calculado que las pérdidas de productividad (promedio de años laborales perdidos) en Brasil están en alrededor de 22.75 por 1000 años para hombres y 13.63 por 1000 para mujeres. Los gastos médicos que generan las personas atendidas con medicamentos y consultas o son hospitalizadas son muy altos (Schofield, 1994). Un año de tratamiento con amodiorona, que permite el control de arritmias cardíacas tiene un costo de 150 dolares en Estados Unidos; Los vasodilatadores y diuréticos tienen un costo similar. El costo de las consultas médicas y la hospitalización de pacientes en fase crónica es de 350 a 1630 dolares por año según su gravedad. En afectación intestinal, una cirugía puede costar hasta 2,000 dolares en y el costo de la implantación de un marcapasos puede ser de hasta 6,000 dolares en EU. Hay que tomar en cuenta las pérdidas económicas debidas a muertes precoces, las pérdidas indirectas de productividad y los subsidios gubernamentales pagados a las personas discapacitadas. En Chile se calculó que el costo anual nacional por las pérdidas económicas debidas a enfermedad de Chagas es de 37 mil dólares por año para ese país, considerando 10,000 casos. Por lo que el costo anual por enfermedad de Chagas asciende a 2,000 millones de dólares por año para todo el continente Americano. Por otro lado, se deben tomar en cuenta los gastos debidos al ausentismo en las personas infectadas, pues los esfuerzos físicos no los pueden realizar de la misma manera, por incapacidad deberán de dejar de trabajar.

Para el control de la enfermedad de Chagas en zonas endémicas también hay un gasto adicional relacionado al uso de insecticidas. Se ha calculado un gasto total entre 3 y 5.53 dólares por casa fumigada, de 18.53 dólares por gastos operacionales de la unidad que incluye transportes y sueldos. Esto quiere decir que en una zona con 100 casas el costo de la fumigación asciende en alrededor de 420 dolares, casi 5000 pesos para fumigar en una sola ocasión. En México, hay zonas de alrededor de 1000 viviendas lo que costaría 50,000 pesos para su fumigación. Si se recomienda hacerla dos veces al año, entonces el costo es de 100,000 pesos por esta zona. Sin tomar en cuenta el daño ecológico, ya que repercute en la contaminación de cultivos que pueden conducir a intoxicaciones y por tanto más medidas de atención médica.

Problema de investigación

¿Se presenta variabilidad interclonal a nivel biológico, inmunológico y molecular en las cepas de *T. cruzi* aisladas en México mostrando un comportamiento estable a través del tiempo y sus variables biológicas están asociadas a sus patrones moleculares y antigénicos?

Justificación

A pesar del conocimiento de la variabilidad interclonal en cepas sudamericanas no se sabe si en las aisladas en México existe variabilidad interclonal y si las clonas son estables con el tiempo. Este conocimiento permitirá entender la variabilidad en los cuadros clínicos de la enfermedad de Chagas, en las diferentes regiones que se han estudiado. Por otro lado, este trabajo permitirá entender la estabilidad de las clonas de *T. cruzi* explicando si todas las cepas pueden estabilizarse o eliminarse con el tiempo pues es bien sabido que algunas cepas llegan a eliminarse por si mismas. El hecho de trabajar con cepas aisladas de triatomíneos también permitirá saber si la fuente de procedencia tiene que ver en la variabilidad interclonal de una cepa. Este trabajo complementa otros estudios sobre el comportamiento de *T. cruzi* pues se han estudiado de manera exhaustiva en Sudamérica. Pero no se las cepas aisladas en México. También dará pauta para valorar si es necesario clonar las cepas antes de caracterizarlas o no es necesario. Por otro lado será interesante saber si las variables biológicas de virulencia e infectividad están estrechamente relacionadas con sus patrones de DNA y antigénicos.

Hipótesis

Si las cepas de *T. cruzi* presentan variabilidad en su comportamiento biológico entonces seguramente están constituidas por diferentes clonas las cuales cada una presenta distintas características intrínsecas.

OBJETIVOS

Objetivo General

Determinar el grado de variabilidad interclonal dentro de las cepas de *T. cruzi* aisladas a partir de triatomíneos colectados en México, su estabilidad a través del tiempo y el grado de asociación entre variables biológicas y antigénicas.

Objetivos particulares

1. Evaluar el proceso de clonación biológica de *T. cruzi* mediante tres técnicas.
2. Determinar la variabilidad interclonal en aislados mexicanos de *T. cruzi* obtenidos de triatomíneos mediante sus características de virulencia e infectividad.
3. Estimar el tiempo de estabilidad en comportamiento de las clonas obtenidas a partir de aislados de *T. cruzi*.
4. Determinar la variabilidad interclonal a nivel antigénico y molecular mediante RAPDs.

Diseño experimental

Es un estudio observacional, descriptivo y exploratorio. Se aislaron seis cepas de *T. cruzi* a partir de triatomíneos de diferentes especies. Cada cepa se clonó mediante tres técnicas: siembra en agar, por dilución y por microgota; una vez clonadas se demostrará variabilidad interclonal estudiando sus comportamientos en el ratón y en medio de cultivo celular, para determinar su infectividad y virulencia. La variabilidad se realizó a tres niveles: biológico, antigénico y molecular. La estabilidad de las clonas se evaluó en un año de mantenimiento en ratones y medios de cultivo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Aislamiento e identificación de *T. cruzi*

Todos los aislados de *T. cruzi*, excepto Tequesquitengo, fueron obtenidos a partir de las heces de triatominos. En la siguiente tabla se muestra el origen de cada aislado:

Tabla 1. Origen de los aislados de *T. cruzi*.

Cepa	Huésped	localidad	Estado
BS ITRI/MX/97/Ver-02	<i>T. dimidiata</i>	Boca de la Sierra	Veracruz
T5 ITRI/ MX/97/Ver-01	<i>T. dimidiata</i>	Xuchiles	Veracruz
Querétaro ITRI/ MX/86/Qro-01	<i>T. barberi</i>	La Cueva	Querétaro
Purísima ITRI/ MX/97/Qro-02	<i>T. barberi</i>	Purísima de la Cueva	Querétaro
Oaxtepec ITRI/ MX/97/Mor-02	<i>T. pallidipennis</i>	Oaxtepec	Morelos
Tequesquitengo MSUI/MX/94/Mor-01	<i>T. pallidipennis</i>	Tequesquitengo	Morelos

Una vez que se colectaron los triatominos se les presionó el abdomen con pinzas de disección de manera que al defecar las heces cayeran sobre un portaobjetos; al portaobjetos con las heces se le agregó una gota de solución salina isotónica y se cubrió con cubreobjetos para observar bajo el microscopio compuesto. Si la muestra presentaba microorganismos flagelados

entonces se procedía a realizar un frote con la misma muestra y teñir con colorante Giemsa, para ello se dejó secar cada muestra y enseguida se agregó metanol hasta secarse y se agregó Giemsa durante 10 min. Cada muestra se lavó, dejó secar y se observó al microscopio. El criterio para identificar a *T. cruzi* fue dividido en dos partes de acuerdo a Souza (1999), y Schmidt y Roberts (2000): 1) morfológicamente, si su cinetoplasto era grande (más que otros trypanosomas); 2) al infectar a ratones se producía amastigotes en algún órgano (en este caso se escogió el corazón de los roedores).

Si había sospecha de que fuera *T. cruzi* por su morfología, se tomaba la muestra de heces colectando con una jeringa de 1 mL e inmediatamente se inoculaba por vía intraperitoneal un ratón CD-1 macho de cuatro semanas de edad (con peso de 13 a 17 gramos); lo anterior con la finalidad de que se facilitara el aislamiento ya que este huésped es susceptible a la infección.

Cada ratón fue observado cada tercer o cuarto día; en cada revisión se cortaba un trozo pequeño de su cola a manera de provocar sangrado. Una gota de sangre de cada ratón se colocaba sobre un portaobjetos y se cubría con cubreobjetos para observar bajo el microscopio. Si había flagelados de *T. cruzi* entonces se sangraba por punción cardiaca, previa anestesia con éter. La mayor cantidad de sangre se obtenía para inocular dos ratones CD-1, machos de 20-30 g de peso y 6-8 semanas de edad. Mientras los ratones se mantenían en el laboratorio, a los primeros ratones que ya estaban sacrificados, se les obtenía el corazón y se procedía a realizar cortes histológicos, como más adelante se describe. Se revisaron 20 cortes histológicos para búsqueda de amastigotes, en caso de encontrarlos se declaraba como aislado de *T. cruzi*.

Los parásitos que se desarrollaron en los ratones fueron obtenidos por punción cardiaca y se procedió a realizar la clonación.

Clonación y subclonación

Los ratones en los que se aislaron las cepas de *T. cruzi* fueron sangrados por punción cardiaca y los tripomastigotes sanguíneos fueron separados de los glóbulos rojos, plasma y

plaquetas, mediante a gradiente de centrifugación con una solución de lymphoprep de la siguiente manera: 1 mL de lymphoprep se colocó en un tubo de centrifugación de fondo cónico de 15 mL, estéril y de poliestireno; sobre esta solución se depositó la sangre de los ratones de manera que quedara sobre aquella solución. Se centrifugó a 900Xg por 45 min a 4°C. El sobrenadante se descartó y la capa de glóbulos blancos que quedó encima de la de glóbulos rojos se recogió con pipeta pasteur estéril y se transfirió a un microtubo estéril de 1.5 mL. Se tomó una gota de esta suspensión y se colocó en una cámara de Neubauer para finalmente contar los parásitos encontrados. Los trypanosomas se lavaron con una solución de PBS-albúmina y se centrifugaron a 900Xg durante 5 min; luego se contaron en cámara de Neubauer y se diluyeron en solución de PBS hasta tener un parásito por cada 50 μ L, debido a que este volumen es igual a una gota de solución aproximadamente y que al clonar se separará la suspensión en gotas. La técnica de clonación fue realizada de acuerdo al método de Miles (1975) que consistió en lo siguiente: de la suspensión con parásitos lavados, gota a gota de la misma fue colocada dentro de pozos de poliestireno estériles (una gota por pozo), los cuales se observaron bajo el microscopio invertido diariamente hasta que los pozos contenía un solo parásito se seleccionaron para continuar con el estudio, entonces cada pozo con un parásito se completó a 300 μ L de PBS a 35°C. Para cada cepa se utilizaron 30 pozos. Se incubaron a 28°C durante un semana o hasta que formaran una colonia de innumerables microorganismos, con el fin de tener suficiente cantidad para realizar las subsecuentes determinaciones de virulencia e infectividad.

La suspensión completa de cada pozo con un trypanosoma fue inoculada por vía i.p. a un ratón CD-1 macho de 20-30 g de peso y 6-8 semanas de edad. Esta manipulación se repitió para cada pozo que contenía un parásito. Los ratones se fueron revisando cada tercer o cuarto día durante 45 días. A cada ratón se cortaba la punta de la cola, de manera de provocar salida de sangre. Dicha sangre, entre porta y cubreobjetos se revisaba bajo el microscopio compuesto. Después de varias semanas (entre 4 y 10) los ratones con parasitemia fueron seleccionados para

continuar con el estudio. A cada ratón con parasitemia se le consideró infectado con una clona. Para incrementar la cantidad de parásitos, cada ratón se sangró por punción cardíaca, y por cada clona, la sangre del ratón con parasitemia se inoculó a cuatro ratones CD-1 machos de 6-8 semanas de edad. Después de varias semanas y cuando los ratones presentaron parasitemia se prepararon para realizar tres actividades: 1) los parásitos se diluyeron en solución de PBS hasta obtener 1×10^6 trypanosomas por mL que fueron utilizados para la determinación de virulencia en ratones Balb/c; otra parte de la suspensión se empleó para la determinación de infectividad en cultivos celulares; Por otro lado, cada clona fue subclonada, es decir se volvieron a clonar como se indica arriba esto fue solo para las clonas pues fue una reclonación (solo para la cepa T5 pues fue la única que demostró variabilidad interclonal).

Determinación de la virulencia *in vivo*

Grupos de 10 ratones hembras Balb/c de 6-8 semanas de edad y 20 ± 1 g de peso fueron inoculados cada uno por vía i.p. con 1×10^5 tripomastigotes sanguíneos de cada una de las clonas o con la cepa parental, en un volumen final de 200 μ L.

A lo largo del tiempo de infección se registró la cinética de parasitemia, mortalidad acumulada e histotropismo. La parasitemia se registró cada tercer o cuarto día durante 60 días la siguiente manera: a cada ratón se cortaba la punta de la cola con la finalidad de sangrarlo, la sangre se depositaba sobre un portaobjetos limpio y seco y con micropipeta se obtenía 10 μ L de sangre los cuales se mezclaron con 90 μ L de cloruro de amonio al 0.87% con la finalidad de lisar glóbulos rojos; los tripanosomas se contaron en una cámara de Neubauer observando la cantidad de ellos bajo el microscopio de luz. Se registró la mortalidad acumulada a lo largo de los 60 días de infección. El histotropismo se determinó en cada ratón cuando moría o bien, si al término de los 60 días, los ratones seguían vivos entonces se practicaba eutanasia para determinar el histotropismo de cada cepa o clona de *T. cruzi* de la siguiente manera: nueve órganos se disecaron en cada ratón: cerebro, corazón, pulmón, bazo, hígado, esófago, intestino

grueso, músculo esquelético y riñón. Los órganos fueron colocados en un recipiente conteniendo buffer de fosfatos (PBS) con formol al 10%. Los órganos, después de 3 días de fijación se colocaron embebidos en un bloque de parafina. A cada órgano se le practicó 10 cortes obteniendo secciones de 5- μm de grosor; cada corte se realizaba en espacios de 50 μm . Se sometieron al proceso de tinción con eosina-azul de metileno. Cada corte se montó en laminillas de porta y cubreobjetos y se observaron bajo el microscopio de luz a una amplificación de 1000X, revisando al azar 100 campos. Se registró el número de nidos de amastigotes en cada órgano.

Determinación de la infectividad en cultivos celulares

Para determinar la capacidad infectiva tanto de cepas como de clonas de *T. cruzi* se emplearon cultivos de células Vero. Para ello las células Vero se colocaron sobre portaobjetos limpios, desengrasado y secos de 1 cm^2 cubiertos con 0.1% de gelatina nutritiva. Las células se incubaron a 37°C en 5% de CO_2 , en ambiente húmedo, en un volumen de 50 μL de medio MEM (medium Eagle's minimum essential) suplementado con 10% de suero fetal bovino (FBS), 100 UI de penicilina, 100 μg de estreptomycin, bajo condiciones de esterilidad. Las células Vero se pegaban en 9 horas de incubación en que las células formaban una monocapa. A cada portaobjetos con las células Vero se les adicionaba una suspensión de 1×10^5 tripomastigotes sanguíneos de tal forma de tener células Vero/ tripomastigotes en una proporción de 10:1. Los portaobjetos con las suspensiones de parásitos con las células Vero se incubaron a 37°C durante 8 horas para permitir la internalización del parásito a las células Vero. Después de 8 horas de incubación los cultivos se lavaron completamente con medio MEM sin FBS para remover los parásitos libres y enseguida fueron incubados nuevamente a 37°C durante 72 h y 96 h. Los portaobjetos fueron lavados 3 veces con medio FBS, sin FBS y fijados con metanol durante 3 minutos; fueron secados, teñidos con Giemsa y montados en portaobjetos y encima con un cubreobjetos. La infectividad se determinó tomando en cuenta dos parámetros: porcentaje de

células Vero infectadas con *T. cruzi* y el índice de infección. Cada preparación se observaba bajo el microscopio de luz a una amplificación de 1000X observando 100 campos. El índice de infección se determinó registrando el número promedio de parásitos por célula Vero, revisando 200 células Vero, por triplicado.

Determinación de patrones antigénicos

Preparación de extracto antigénico: Los parásitos desarrollados en medio de cultivo Liver infusión tryptose (LIT) se pasaron a tres subcultivos de 10 mL del mismo medio, se incubaron a 27°C durante 10 a 15 días, hasta tener el máximo de desarrollo en su curva de crecimiento, aproximadamente una dos semanas. Enseguida se realizó un pase de los tres subcultivos a un matraz de 125 mL conteniendo 50 mL de medio LIT. Después de alcanzar la muestra su máximo crecimiento se pasó la suspensión a un matraz Erlenmeyer de 500 mL con 200 mL de medio LIT incubando en las mismas condiciones. Cuando los parásitos alcanzaron el máximo desarrollo se cosecharon de la siguiente manera: El contenido se pasó a tubos de polipropileno de 50 mL de fondo cónico cerrados herméticamente, se centrifugaron a 1300Xg durante 25 min a 4°C; se descartó el sobrenadante y el paquete de parásitos se resuspendió en 10 mL de solución DPBS a pH 7.2, se mezclaron los contenidos de los tubos para hacer un solo tubo de 50 mL. Se repitió la centrifugación durante 15 min a 1300Xg a 4°C. El paquete se volvió a resuspender en 10 mL de DPBS y se tomó una alícuota para conteo de epimastigotes y cuantificar formas de *T. cruzi*. Este último lavado se volvió a repetir resuspendiendo el paquete de parásitos en 5 mL de solución TRIS 50 mM - CHAPS 10 mM. El paquete se resuspendió y se sonicó a 35 watts durante 10 pulsos de 60 segs con descansos de 30 segs sobre hielo - etanol. El sonicado se colocó sobre hielo e inmediatamente se agregó una solución que contenía PMSF (100 µg) - peptatina 2 mM. El sonicado se resuspendió sobre hielo y se ultracentrifugó a 23 000Xg, 1 hr a 4°C. El sobrenadante se pasó a

microtubos de 1.5 mL estériles y se taparon colocándolos sobre hielo. A este extracto se le denominó extracto antigénico soluble de *Trypanosoma cruzi* (TcSA); los tubos se guardaron a -70°C hasta su uso.

Determinación de proteínas del TcSA

Una de las alícuotas almacenadas de TcSA se empleó para determinación de proteínas por la técnica de Bradford. Para ello se determinó la curva estándar con albúmina sérica bovina (BSA) a concentraciones de 0.5 a 10 µg/100 µL en DPBS, a partir de un stock de BSA a 1 mg/mL. El TcSA se diluyó a 1/10, 1/20 y 1/40. Todas las determinaciones se hicieron por triplicado. Después de haber aplicado cada muestra en cada pozo de la placa de poliestireno se agregó el reactivo de Bradford, se agitó la placa 20 segs suavemente y se leyó a 600 nm después de 10 min. Los resultados indicaron una concentración de TcSA de 840 µg/mL, siendo 3.78 mg de proteína de TcSA en 1.251×10^9 epimastigotes.

Electroforesis en gel de poliacrilamida de TcSA

Se armó el dispositivo de vidrios para la electroforesis sobre base de “celloseal” y se preparó el gel de corrida al 10% (acrilamida-bis acrilamida 10 mL, H₂O 12 mL, TRIS 1.5 M ph 8.8, SDS al 10%), a la muestra desgasificada se agregó persulfato de amonio al 10% (75 µL) y TEMED concentrado 5 µL. Se colocó entre los vidrios para la electroforesis con pipeta pasteur. Enseguida se agregó agua bidestilada hasta alcanzar 0.5 cm por arriba del gel de corrida y se esperó hasta polimerizar (aprox 20-25 min). Se retiró el agua y se agregó el gel concentrador (H₂O 9.1 mL, archilamida –bis archilamida 1.7 mL, TRIS 1M pH 6.8 1.6 mL, SDS al 10% 0.125 mL), se mezcló y desgasificó 10 min, se agregó persulfato de amonio 62 µL y TEMED 6.2 µL. se colocó el peine y dejó polimerizar. Se agregó un buffer de TRIZMA base, glicina, SDS H₂O.

Preparación de muestras: En un microtubo de 1.5 µL se colocaron 22.5 µL de bufer de muestras (2.5 g de SDS, 6.25 µL de Tris 1M pH 6.8, 5 mL de 2-mercapto etanol, 5 mg de azul de

bromofenol, 10 mL de glicerol en 50 mL de agua bidestilada), con 15 μ L de TcSA. El microtubo se calentó en baño maría durante 5 min.

Corrimiento, fijación y tinción del gel: A cada carril se colocaba 30 μ L de muestra o 10 μ L de marcadores de peso molecular. Una vez colocado el gel en la cámara de electroforesis se sometió a corrimiento a 200 voltios por 45 min. Terminada la corrida el gel se separó y colocó dentro de un recipiente conteniendo 100 mL de sol. fijadora de proteínas (ácido acético 5%, metanol al 10%, agua bidestilada 85 mL), y se dejó bajo agitación suave por 12 horas. Se descartó la sol fijadora y se agregó 100 mL del colorante (metanol 50 mL, ac. Acético 10 mL, brilliant blue G-250 0.05g, agua bidestilada 40 mL). Se dejó teñir el gel por 3 horas y media. El gel se enjuagó en sol. de enjuague (metanol 20%, ac. Acético 7%, agua bidestilada 73%), esto se repitió tres veces en espacios de 30 a 60 min por enjuague. Entre dos hojas de papel celofán dulce y vidrio a ajustados se dejó secar el gel en oscuridad por 12 a 16 horas a temperatura ambiente. Si se pretendía hacer reaccionar el antígeno con anticuerpos el gel sin teñir se pasaba a transferencia.

Transferencia: El gel se ponía en contacto con papel de nitrocelulosa en un recipiente conteniendo solución amortiguadora de transferencia (14.4 g de glicina, 3.03 g de glicina, 200 mL de metanol y aforó de 1 l de agua bidestilada enfriada a 4°C). Dentro de un cassette de transferencia se colocó el gel con el papel de nitrocelulosa y ambos se sumergieron dentro de la cámara de electroforesis. La transferencia se realizó a 100 voltios durante 1 hora. El papel de nitrocelulosa se secó para después proceder al inmunoblot.

Bloqueo: Para el Inmunoblot el papel de nitrocelulosa (NC) se colocó en sol. bloqueadora (leche Svelty 10%, DPBS 90 mL). En agitación durante 5 h a 4°C.

Colocación de sueros: Se preparó un suero de conejo inmunizado con TcSA a dilución de 1:500 diluido con leche descremada al 10% en PBS, y el papel de NC se sumergió en la sol. de suero durante 12-16 h a 4°C.

El papel de NC se lavó tres veces en sol de PBS-T20 al 0.1%. en espacios de 2 minutos de lavado. Se sumergió en sol. de suero conjugado GAR-POD (suero policlonal anti-IgG de ratón acoplado a enzima peroxidasa) diluido 1:2000 en sol diluyente de conjugado (PBS T20 al 0.1%). En agitación por 2 h en oscuridad.

Sustrato: se lavó tres veces con PBS T20 al 0.1% y eliminando esta solución se agregó el sustrato (diaminobencidina (50 mg de 3,3'-diaminobencidina, 10 µL de peróxido de hidrógeno al 30%, en 100 mL de Tris 50 mM pH 7.6. Se agitó por 30 min en oscuridad. La reacción se paró agregando agua bidestilada, en dos lavados de 5 min. Y se secó a temperatura ambiente para observar el resultado.

Variabilidad interclonal intra cepa de *T. cruzi* analizada mediante RAPDs

Con la finalidad de caracterizar genéticamente las clonas del stock T5 de *T. cruzi* e investigar si había alguna correlación con la virulencia, se realizó su caracterización mediante la técnica de RAPD (Random Amplified polymorphic DNA). Para ello se cultivaron los parásitos en medio LIT con Suero fetal bovino al 10%, sembrando los parásitos en un volumen de 30 mL. Las clonas que se estudiaron inicialmente fueron las siguientes: T5.1, T5.5, T5.10, T5.9, T5.8 y la cepa parental T5.

Después de una semana de incubación a 28°C los parásitos se cosecharon; para esto se tomó con pipeta Pasteur una alícuota y haciendo una dilución 1:5 en formol 10% con DPBS se contaron los parásitos en cámara de Neubauer. Una vez teniendo $4 \cdot 10^8$ parásitos totales de cada clona se procedió a obtener el DNA.

Extracción de DNA: Se realizó de acuerdo a Medina y Cross (1993). A cada tubo de parásitos de cada clona se realizó el siguiente tratamiento: Se centrifugaron a 1500 rpm durante 10 min. a TA con la finalidad de formar un paquete de parásitos. Se decantó el sobrenadante. A cada paquete se agregó 600 µL de amortiguador de lisis (TRIS-HCl 50mM pH 8.0; EDTA 62.5 mM pH 9.0; LiCl 2.5 M; Tritón X-100 al 4% (v/v). bufer TELT). La suspensión se pasó a

microtubos estériles de fondo cónico de 1.5mL y se incubaron 8 min a TA con agitación suave, aproximadamente 10 min. Enseguida se procedió al tratamiento con fenol: a cada microtubo se agregaron 700 µL de mezcla fenol/cloroformo (4 mL de cloroformo + 4 mL de fenol ultrapuro equilibrado con agua en un tubo de 13 X 100 mm). Los microtubos con las suspensiones se agitaron ligeramente y se incubaron a TA acostados durante 5 min. Se centrifugaron a 1300 rpm, 5min a TA. En estos momentos se formaron tres capas dentro de cada tubo (la intermedia más espesa). La capa superior se separó y se le adicionaron 500 µL de etanol absoluto frío, los tubos se agitaron levemente hasta la formación de un precipitado blanco que corresponde a ácidos nucleicos. Se centrifugaron a 1300 rpm durante 15 min a TA. Se decantó el etanol y se volvió a adicionar 200 µL de etanol sin resuspender. Se centrifugó a 1300 rpm durante 5 min a TA. Se volvió a decantar el sobrenadante invirtiendo los tubos dejándolos sobre papel absorbente. El DNA + RNA se resuspendieron agregando 320 µL de agua estéril bidestilada por cada tubo con mucha delicadeza disueltiendo completamente. Los tubos se almacenaron 2 horas a 4°C.

El DNA se cuantificó tomando una alícuota y diluyendo 1:100 con agua bidestilada estéril. Se leyó a 260 nm. Si las muestras tenían un grado de pureza aceptable (relación Absorbancia a 260 nm/absorbancia a 280 nm > 1.7) se procedía a realizar corrimiento electroforético en un gel de agarosa al 1.5% en bufer TAE. En este caso se mezcló 2-3 µL de bufer de corrida + 5 µL de muestra por pozo. El corrimiento se realizó a 85-90 voltios. Una vez observado la pureza y existencia de DNA mediante el corrimiento anterior se procedió a realizar el RAPD; para ello se mezcló en microtubos de 0.7 mL lo siguiente: 5 µL de Buffer (10X), 1 µL de dNTP's a 10 mM, 1 µL del oligonucleótido a examinar, 1 µL de muestra de DNA, 1 µL de Taq polimerasa, y 21 µL de agua destilada estéril. A cada microtubo se le colocó 1 gota de aceite mineral y se colocaron en el termociclador con el siguiente programa: 15 min a 94 °C, enseguida un programa cíclico de tres pasos: 1 min a 92°C para abrir el DNA, 1 min a 36°C para la unión del oligonucleótido, 2 min a 72 °C para la extensión; esto durante 45 ciclos con una extensión

final de 15 min a 72 °C. Se colocaron igualmente 1.2 µL de marcadores de peso molecular. El corrimiento se realizó a 85 volts. Se probaron 20 diferentes primers, sin embargo los primers que amplificaron tienen las siguientes secuencias:

Primer	secuencia
308	5'-GGT GCC AGCC-3'
307	5'-CAC ACT CCAG-3'
306	5'-AAG CCT CGTC-3'
305	5'-CTC ACC GTCC-3'
R9	5'-TCG ATA CAGG-3'
F02	5'-GTT TCG CTCC-3'

Análisis genético de las clonas mediante la técnica de Southern-Blot

Para este estudio se emplearon tres clonas virulentas (T5.8; T5.9; T5.10), dos avirulentas (T5.5; T5.1), el stock T5 y un stock de baja virulencia (Oaxtepec), cuya virulencia previamente se determinó realizando infección en ratones y con base a este resultado se clasificaron como de alta o baja virulencia. Cada clona se cultivó en medio LIT por 15 días y estando en fase exponencial de crecimiento se procedió a cosechar los parásitos (10 mL de cultivo en un tubo de fondo cónico de 15 mL por cada clona). Cada tubo se centrifugó a 1500 rpm durante 5 minutos, el sobrenadante se eliminó y el paquete se resuspendió en 2 mL de PBS frío para lavarlo. Se repitió la centrifugación y el sobrenadante se eliminó. El paquete se resuspendió en 150 µl de bufer de lisis (TRIS 50 mM pH 8.0; EDTA 62.5 mM pH 9.0 y LiCl 2.5 M; Tritón X-100 al 4%), ayudándose de micropipeta. Los tubos se incubaron 5 min a TA. A cada microtubo se añadió 150 µL de fenol-cloroformo (1:1) equilibrado en agua. Se agitó suavemente por inversión, 5 min para la extracción de DNA. Se centrifugaron 5 min a 4°C a 13000 rpm. Se descartó la fase acuosa (superior) pasándola a otro tubo, al que se le adicionaron 300 µL de etanol absoluto. Se agitó

suavemente para precipitar el DNA, 5 min a TA. Se centrifugó 10 min a 4°C a 13000 rpm. Se aspiró el sobrenadante con micropipèta y el paquete (DNA) se lavó sin resuspender agregando 300 µL de etanol absoluto. Se centrifugó por 5min. El sobrenadante se eliminó y dejó que se evaporara el etanol (10 min a TA). Entonces el paquete se resupendió en 55 µL de bufer TE conteniendo RNAsa pancreática (20 µg/mL). Se incubó 1 h a 37°C. Cada muestra se corrió en gel de agarosa al 0.8% para checar concentración y obtención del DNA. El gel se cargó con 5 µL de la muestra por pozo. Se corrió a 75V, 30 min, luego se tñió con bromuro de etidio 15 min. Cada muestra de DNA de los parásitos se trató con enzimas de restricción, en este caso Hind III; 10 a 20 µL de muestra, 4-8 µL de bufer TE, 2.2 a 2.4 µL de bufer de enzima y 2 µL de enzima, de manera que se tuviera un volumen total de 22.2 µL. El gel se dejó incubando 16 h en oscuridad a 37°C en bufer TBE.

Transferencia: El gel se dejó en un recipiente con agua desionizada 10 min para lavarlo y enseguida en solución desnaturizante (Na Cl 1.5 M, NaOH 0.5 M) 50 min en agitación suave con la finalidad de abrir el DNA. Se enjuagó el gel en agua desionizada y se colocó encima sol. neutralizadora 30 min en agitación suave (NaCl 1.5 M, TRIS base pH 7.0). Se armó el montaje de transferencia poniendo en contacto el gel con papel de nitrocelulosa (NC) en medio de papel Whatman humedecido y debajo de un peso de 500 g, incubando toda la noche. Se separó el papel de NC y se enjuagó en sol SSC (NaCl 3M, Citrato de sodio 0.3 M). El papel de NC se puso a secar entre dos trozos de papel Whatman número 1, 15 min y luego se introdujo en horno a 80°C por 2 h con la finalidad de favorecer que el DNA se pegue al papel de NC.

Preparación de la sonda: se preparó 10 µL de DNA de la sonda (clona pRTC81) a 0.845 µg/µL tamaño del inserto de 1.7 kb; 2 µL de la enzima SacI; 2 µL de buffer de SacI y 6 µL de bufer TE; esto dio un volumen final de 20 µL. Se calentó a 65°C 5 min para desnaturizar el DNA y se corrió electroforéticamente como anteriormente 85 V, 3 h en gel de agarosa al 0.8% para ver concentración de DNA. El DNA se separó del gel y se marcó radiactivamente: se pasó a

un microtubo y se calentó (10 µL) en agua hirviendo (5 min) para desnaturalizar. Se enfrió sobre hielo 3 min y se pasó a un tubo con un kit de dNTP's , excepto dCTP marcado con P³² (dCTP*), luego se mezcló 10 µL de esta mezcla con 35 µL de agua destilada, se adicionó 5 µL de dCTP* y se centrifugó a 37°C 15 min y se paro la reacción con EDTA 0.2 M. a la cual se adicionó 50 µL se centrifugó a 37°C por 15 min y se paró con bufer TE. Esta mezcla se hizo pasar a través de una columna de sephadex G-50, y posteriormente la sonda se calentó 10 min en baño de agua hirviendo y luego sobre hielo 5 min., se añadió la sonda y se incubaron a 37 °C 18 h. La membrana se separó y después de lavarla se colocó solución de lavado (sol. SSC, SDS 0.2%) 1 h a 50°C. Posteriormente se reveló la placa radiográfica.

Análisis estadístico

El criterio para decidir si una cepa es mono- o multiclonal es indicado por el grado de variabilidad en los datos de virulencia en cada parámetro entre las clones de una misma cepa; es decir, si difieren sus clones significativamente en los valores de virulencia entonces la cepa está formada por diferentes o la misma clona si no hay diferencias significativa. La variabilidad interclonal entre las clones se determinó mediante una ANOVA mediante la prueba de Tukey. En todos los casos el valor de $P < 0.05$ fue considerado como significativo. Se tomaron en cuenta los datos de pico de maxima parasitemia, día de maxima parasitemia, mortalidad acumulada, número de órganos infectados; la infectividad se determinó con los cultivos de células Vero infectadas. La prueba estadística ANOVA de Fisher se utilizó para determinar variabilidad entre subclonas de las clones de cepa T5 con un nivel de significancia de valor de p de 0.05. El valor real de diferencia significativa (TSDV) se calculó comparando los datos de virulencia o infectividad entre todas las clonas y subclonas para cada parámetro de virulencia. (Daniel, 1999). Para saber si había asociación entre las diferentes variables de virulencia y los patrones moleculares se realizó el análisis de Mantel-Haenszel (Daniel, 1999). El grado de

similitud genética se calculó por comparación entre dos muestras (dos clonas, o alguna clona y la cepa parental) determinándolo con el índice de similitud de Jaccard (Chao y cols., 2005).

RESULTADOS

Variabilidad Clonal en las cepas de *Trypanosoma cruzi*

Con la finalidad de saber si las cepas mexicanas de *T. cruzi* son mono- o multiclonales determinando la variabilidad entre las clonas que pertenecen o derivan de una misma cepa, se obtuvieron 10 clonas de cada una de las seis cepas, excepto la cepa T5 de la que se obtuvieron 11 clonas.

En la tabla II se puede observar que la mortalidad acumulada para las clonas de la cepa T5 es superior a la observada en las restantes cepas. Únicamente la cepa T5 presentó variabilidad al tomar en cuenta todos los parámetros de virulencia e infectividad, y de acuerdo a los valores estadísticos calculados con la prueba F de Tukey sólo la cepa T5 tuvo variabilidad clonal estadísticamente significativa ($p < 0.05$) (tabla II).

Tabla II. Variabilidad Interclonal entre las clonas derivadas de cada cepa de *Trypanosoma cruzi*.

Cepa	Virulencia <i>in vivo</i>					Infectividad <i>in vitro</i>	
	Mortalidad (%)	PMP	DMP	OI	MOI	Porcentaje de células Vero infectadas	Indice de infección
Querétaro	40.0 ± 8.2	4.8 ± 0.2*	20.0 ± 2.1*	5	3.9 ± 0.9*	35.5 ± 4.3*	1.8 ± 0.5*
Purísima	0.0	2.3 ± 0.4*	26.8 ± 3.32*	1	0.6 ± 0.51*	0.0*	0.0*
Oaxtepec	8.0 ± 4.2	0.4 ± 0.2*	34.6 ± 4.3*	1	0.8 ± 0.9*	3.8 ± 1.0*	0.9 ± 0.3*
Teques	33.0 ± 8.2	3.4 ± 0.9*	32.5 ± 2.4*	2	1.8 ± 0.5*	2.8 ± 0.9*	1.3 ± 0.7*
BS	0.0	0.3 ± 0.1*	36.0 ± 2.6*	0	0.0*	0.0*	0.0*
T5	57.3 ± 44.3	8.5 ± 9.1†	33.5 ± 9.3†	9	4.7 ± 3.1†	29.0 ± 23.9†	2.1 ± 0.3†

Los datos representan la media ± desviación estándar para todos los parámetros medidos entre las clonas derivadas de cada cepa. PMP: pico de máxima parasitemia (1×10^6 BT/mL de sangre); DMP: día de máxima parasitemia; OI: No. máximo de órganos infectados para cualquier clona; MOI: media de órganos infectados; Los datos de infectividad en cultivos celulares fue determinados a las 72 h de incubación. * = resultados en los cuales $F < F_{p0.05}$ y $P > 0.05$ (no hay variabilidad estadísticamente significativa); † = resultados en los cuales $F > F_{p0.05}$ y $P < 0.05$ (hay variabilidad estadísticamente significativa).

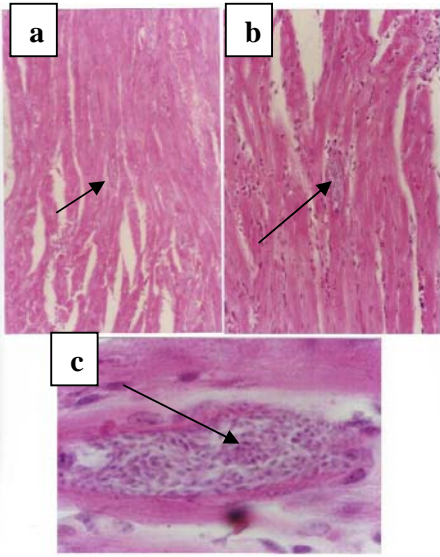


Fig. 4. Nidos de amastigotes en tejido Cardíaco (a) 10X; (b) 40X; (c) 100X.

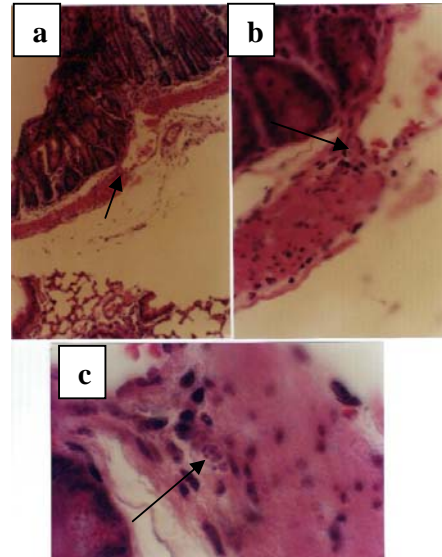


Fig. 5. Nidos de amastigotes en intestino: (a) 10X; (b) 40X; (c) 100X.

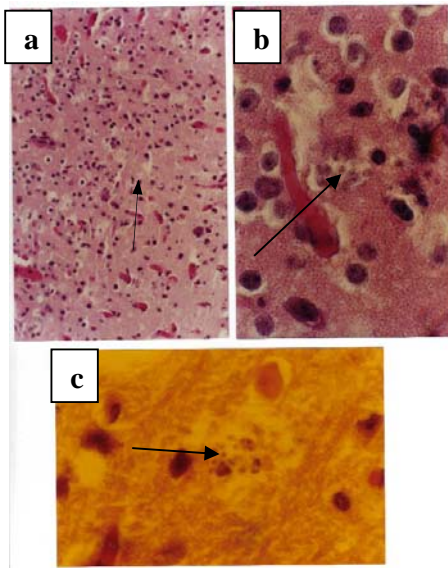


Fig. 6. Nidos de amastigotes en tejido Nervioso: (a) 10X, (b) 40X; (c) 100X.

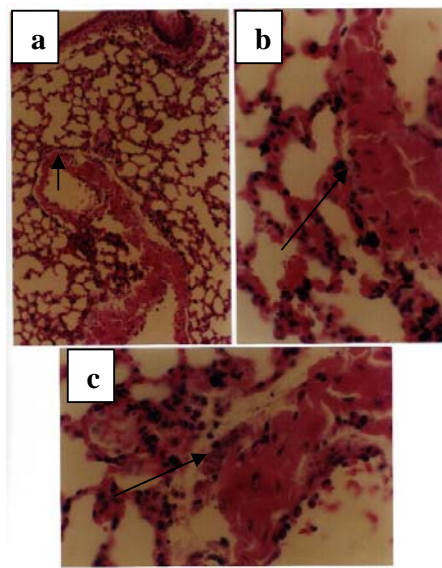


Fig. 7. Nidos de amastigotes en pulmón: (a) 10X, (b) 40X; (c) 100X.

Variabilidad en clonas aisladas de la cepa parental T5

La tabla III representa los datos de virulencia e infectividad de cada clona derivada de la cepa parental T5. Se puede observar que las clonas mostraron gran variabilidad entre ellas en todos los parámetros estudiados, tanto en ratones infectados como en cultivos celulares. La mortalidad varió del 0 al 100%; la mortalidad inducida por la cepa parental fue intermedia entre la ocasionada por las clonas más y las menos virulentas. Mediante la prueba F of Tukey se pudo comprobar que en todos los parámetros estudiados las clonas mostraron variabilidad estadísticamente significativa ($p < 0.05$). Este resultado parece agrupar a las clonas de la cepa T5 en al menos dos grupos, uno con valores bajos y otro con altos de virulencia de acuerdo con el estimado estadístico para calcular TSDV (ver material y métodos). Por ejemplo, en el caso de pico de máxima parasitemia las clonas T5.5, T5.1, T5.4, T5.6, y T5.3 pudieron ser clasificadas en un grupo de baja parasitemia (menos de 2×10^6), y las restantes clonas en otro grupo que produjeron más de 6×10^6 tripomastigotes sanguíneos/mL de sangre. Con los otros parámetros de virulencia e infectividad las clonas también se agruparon en alta y baja infectividad y virulencia. Sin embargo, dicha agrupación reúne a diferentes clonas en cada parámetro estudiado. En el caso de la media de órganos infectados por ratón solo las clonas T5.5, T5.1, y T5.4 se pudieron conjuntar en un grupo; Para el porcentaje de células Vero infectadas a 72 h de incubación las clonas T5.5 y T5.2 formaron un grupo, y T5.1, T5.4 y T5.6 formaron un segundo grupo, las clonas restantes se conjuntaron en otro u otros grupos más. Por este resultado fue interesante saber si cada clona presentaría variabilidad intraclonal. Esa es la razón por la que las clonas de T5 fueron subclonadas. Pero solo se seleccionaron dos clonas de alta y dos de baja virulencia e infectividad a la mayoría de los parámetros estudiados. En este caso T5.5 y T5.4 como clones de baja y T5.10 y T5.8 como clonas de alta virulencia e infectividad.

Tabla III. Infectividad y virulencia de la cepa parental T5 y sus clones en ratones y cultivos de células Vero.

Clonas	Virulencia <i>in vivo</i>					Infectividad <i>in vitro</i>			
	Mortalidad (%)	PMP	DMP	OI	MOI	Porcentaje de células Vero infectadas		Índice de Infección	
						72 hr	96 hr	72 hr	96 hr
T5.5	0	0.1 ± 0.1	49.6 ± 1.6	2	0.9 ± 0.7	2.3 ± 0.8	4.0 ± 0.5	1.6 ± 0.4	1.8 ± 0.2
T5.1	30	0.3 ± 0.1	36.9 ± 1.2	1	0.5 ± 0.5	5.4 ± 1.3	11.0 ± 1.5	1.9 ± 0.3	2.0 ± 0.1
T5.4	0	0.4 ± 0.1	38.4 ± 1.3	1	0.4 ± 0.5	6.2 ± 0.8	8.2 ± 0.3	1.9 ± 0.6	1.6 ± 0.2
T5.6	10	1.8 ± 0.2	48.5 ± 3.0	6	4.3 ± 1.2	4.0 ± 1.3	4.3 ± 0.8	1.8 ± 0.5	2.2 ± 0.4
T5.3	20	0.7 ± 0.1	32.4 ± 2.1	4	3.3 ± 0.8	2.3 ± 0.3	3.3 ± 0.6	2.1 ± 0.3	2.1 ± 0.3
T5.2	90	21.5 ± 1.9	29.5 ± 1.3	5	4.2 ± 0.8	23.0 ± 2.0	41.0 ± 1.8	1.7 ± 0.4	2.0 ± 0.2
T5.7	90	15.2 ± 1.7	25.6 ± 1.5	8	6.3 ± 1.2	83.2 ± 2.0	71.2 ± 2.4	3.1 ± 0.4	2.1 ± 0.3
T5.11	90	6.6 ± 0.9	31.6 ± 2.5	9	7.5 ± 1.0	27.0 ± 2.2	41.2 ± 2.0	1.6 ± 0.2	1.8 ± 0.4
T5.8	100	15.1 ± 1.5	23.4 ± 1.9	9	8.3 ± 0.8	44.7 ± 1.3	41.7 ± 1.0	2.9 ± 0.4	2.7 ± 0.3
T5.10	100	24.6 ± 2.0	20.6 ± 2.2	9	8.8 ± 0.4	40.7 ± 1.3	36.7 ± 1.3	1.5 ± 0.3	2.5 ± 0.1
T5.9	100	7.6 ± 0.8	31.9 ± 2.5	9	6.9 ± 1.0	41.3 ± 2.6	57.0 ± 1.5	2.0 ± 0.3	2.4 ± 0.2
T5 parental	80	4.5 ± 3.6	24.8 ± 5.1	9	6.4 ± 1.3	31.8 ± 4.6	34.8 ± 1.5	1.6 ± 1.2	2.7 ± 1.0

Para todos los parámetros los datos representan la media ± desviación estándar entre las clonas derivadas de cada cepa. Las abreviaturas en cada parámetro son las mismas que en la tabla I. $F > F_{p0.05}$ y $P < 0.05$ para todos los parámetros (hay variabilidad estadísticamente significativa entre todas las clonas).

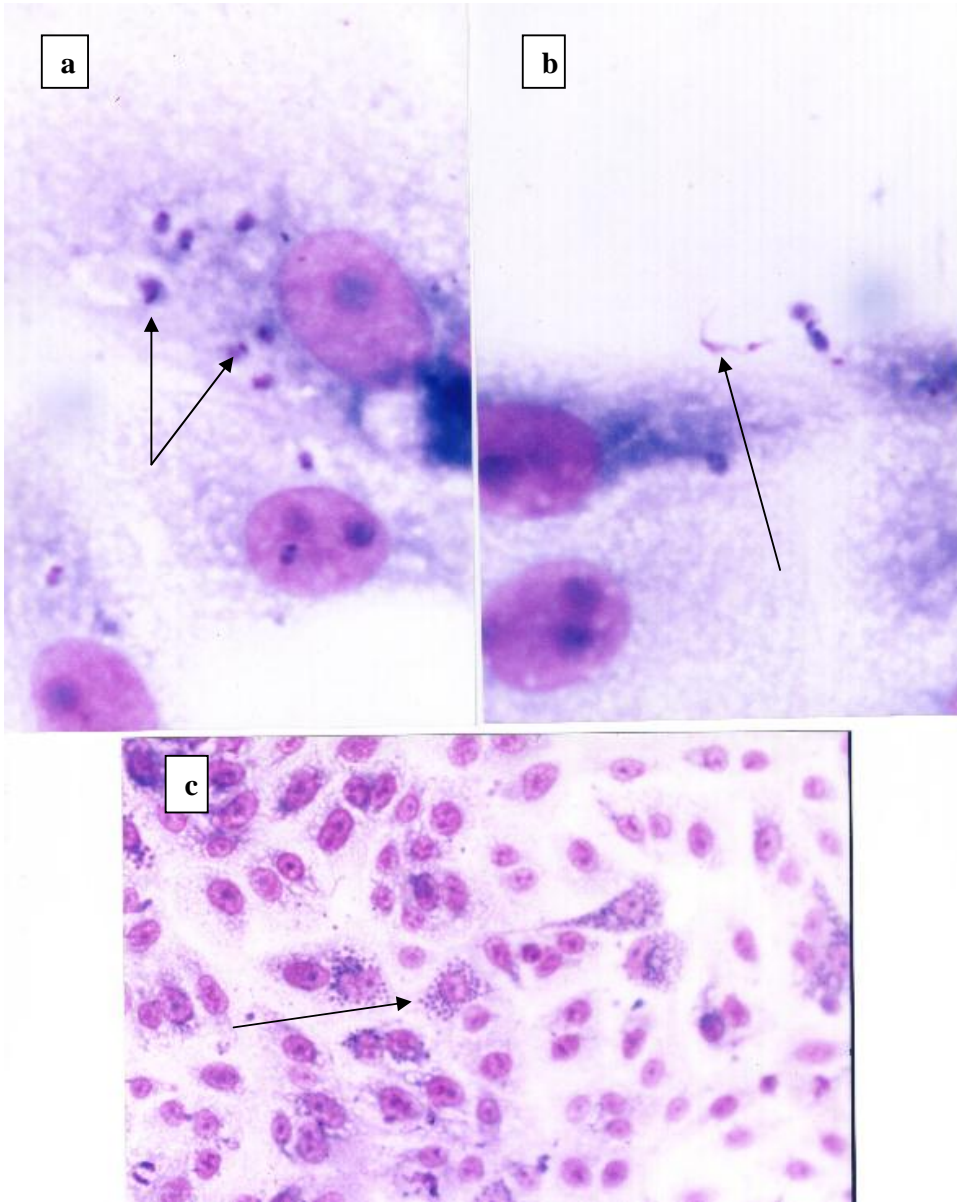


Fig. 8. Células Vero infectadas con *T. cruzi*. (a) tres células Vero con amastigotes de *T. cruzi* invadiendo su citoplasma, amplificación a 100X; (b) se observa como un tripomastigote está unido a la superficie de la célula Vero, amplificación a 100X; (c) Varias células Vero presentan en su citoplasma nidos de amastigotes de *T. cruzi* (ver flechas).

Infectividad y Virulencia de las subclonas

Las subclonas derivadas de su correspondiente clona de la cepa T5 no presentaron variabilidad intraclonal, excepto para las clonas T5.4 and T5.10 en el pico de máxima parasitemia y el porcentaje de células Vero infectadas, respectivamente (tabla IV). Para los parámetros restantes, los valores de F fueron $p>0.05$, lo que significa que la varianza fue similar para las subclonas derivadas de una clona, y por eso no fue necesario hacer una segunda subclonación. El comportamiento de las subclonas fue el mismo que de sus respectivas clonas, ya sea de baja o alta virulencia e infectividad. En la tabla IV se observa respecto a su capacidad infectiva la de las subclonas derivadas de las clonas T5.5 y T5.4 fue baja, y las T5.10 y T5.8 fue alta.

Tabla IV. Infectividad de subclonas derivadas de las clonas de la cepa parental T5 en ratones y en células Vero.

Clonas	Subclonas	<i>in vivo</i>					<i>in vitro</i>	
		Mortalidad (%)	Virulencia		OI	MOI	Porcentaje of células Vero infectadas	Indice de Infección
			PMP	DMP				
T5.5	T5.5.a	10	1.4 ± 0.2	49.9 ± 1.5	2	1.0 ± 0.8	1.7 ± 0.3	1.6 ± 0.1
	T5.5.b	0	1.5 ± 0.2	50.5 ± 2.1	2	1.0 ± 0.8	1.8 ± 0.3	1.8 ± 0.1
	T5.5.c	0	1.5 ± 0.3	50.5 ± 1.3	2	1.0 ± 0.8	1.8 ± 0.6	1.7 ± 0.1
T5.4	T5.4.a	10	0.7 ± 0.2	37.0 ± 1.2	2	1.1 ± 0.9	4.0 ± 0.5	1.5 ± 0.3
	T5.4.b	0	0.5 ± 0.2	37.7 ± 1.2	2	1.0 ± 0.8	4.3 ± 0.3	1.7 ± 0.2
	T5.4.c	10	0.4 ± 0.1	37.1 ± 1.4	2	1.3 ± 0.7	3.7 ± 0.3	1.7 ± 0.2
T5.10	T5.10.a	90	24.0 ± 1.5	21.4 ± 2.5	9	8.5 ± 0.7	24.2 ± 1.3	2.2 ± 0.1
	T5.10.b	90	23.2 ± 1.4	21.5 ± 1.5	9	8.5 ± 0.5	24.7 ± 1.1	2.3 ± 0.2
	T5.10.c	100	23.8 ± 1.2	21.0 ± 1.4	9	8.7 ± 0.5	26.8 ± 0.8	2.5 ± 0.1
T5.8	T5.8.a	100	24.9 ± 0.9	24.2 ± 1.5	9	8.2 ± 0.4	30.8 ± 1.3	2.3 ± 0.1
	T5.8.b	100	24.9 ± 1.2	24.7 ± 1.2	9	8.3 ± 0.5	30.7 ± 1.3	2.5 ± 0.2
	T5.8.c	100	24.1 ± 1.0	25.1 ± 0.7	9	8.4 ± 0.5	31.3 ± 2.5	2.4 ± 0.1

Para todos los parámetros los datos representan la media ± desviación estándar entre las subclonas derivadas de cada clona. Las abreviaturas en cada parámetro son las mismas que para la tabla I. Sólo los datos de PMP para las subclonas T5.4, y el porcentaje de células Vero infectadas para subclonas T5.10 tuvieron $F > F_{p0.05}$ y $P < 0.05$.

Comportamiento de las clonas un año después de su mantenimiento en ratones

Con la finalidad de saber si las clonas de la cepa T5 eran estables a lo largo del tiempo, ellas fueron mantenidas durante un año tanto en ratones como en medio axénico LIT. El comportamiento de cada clona de la cepa T5 fue similar en ratones (tabla V). Las clonas, en conjunto, mostraron variabilidad de acuerdo a los valores de F de Tukey ($p < 0.05$). Cinco de las clonas fueron de baja virulencia (ver datos de mortalidad, pico de máxima parasitemia, número de órganos infectados y porcentaje de células Vero infectadas). Es importante decir que las clonas cuya mortalidad varió del 90 al 100% mostraron picos de máxima parasitemia superiores a 7×10^6 tripomastigotes/mL de sangre, por ratón. Las clonas T5.3 y T5.2 presentaron virulencia intermedia para varios parámetros, sin embargo T5.2 causó alta, y T5.2 baja mortalidad en los ratones. La cepa parental T5 también mostró virulencia intermedia con respecto a las clonas, aunque cercana a los valores para las clonas agrupadas como virulentas. Con relación a la infectividad *in vitro*, las clonas mostraron variabilidad ($p < 0.05$). Sin embargo, fue más difícil agruparlas de acuerdo a su habilidad infectiva ya que, por ejemplo, en el porcentaje de células Vero infectadas pudieron formar un grupo las clonas T5.5, T5.1, T5.4, T5.6, y T5.3 cuyos porcentajes variaron de tres a poco más de 5%, y el otro grupo infectó en más del 37%. Sin embargo, en el parámetro de índice de infección la agrupación sería diferente porque todas las clonas presentaron un índice de infección cercano entre ellas.

Tabla V. Infectividad de las clones de la cepa T5 después de haberse mantenido en ratones durante un año.

Clonas	Virulencia <i>in vivo</i>				Infectividad <i>in vitro</i>		
	Mortalidad (%)	PMP	DMP	IO	MOI	Porcentaje de células Vero infectadas	Índice de infección
T5.5	0	1.1 ± 0.1	52.6 ± 1.6	2	1.6 ± 0.5	3.2 ± 0.3	2.1 ± 0.1
T5.1	10	1.7 ± 0.5	41.9 ± 3.1	1	1.0 ± 0.0	10.8 ± 0.8	2.5 ± 0.1
T5.4	10	2.0 ± 0.5	41.0 ± 2.7	2	1.4 ± 0.5	9.2 ± 0.3	2.6 ± 0.0
T5.6	10	2.1 ± 0.2	51.1 ± 2.3	7	5.5 ± 1.0	5.0 ± 0.5	2.7 ± 0.1
T5.3	10	1.6 ± 0.3	28.5 ± 1.8	6	4.2 ± 0.9	4.5 ± 0.5	2.5 ± 0.4
T5.2	100	23.2 ± 2.1	27.3 ± 1.6	5	4.2 ± 0.4	45.7 ± 1.0	2.4 ± 0.1
T5.7	90	17.2 ± 1.9	24.2 ± 1.6	8	7.3 ± 0.8	75.2 ± 2.2	2.3 ± 0.1
T5.11	90	7.3 ± 0.5	29.0 ± 2.8	9	8.4 ± 1.0	46.2 ± 2.7	2.1 ± 0.3
T5.8	90	16.7 ± 1.4	21.5 ± 2.7	9	8.5 ± 0.5	43.3 ± 0.8	3.1 ± 0.1
T5.10	100	26.3 ± 1.2	20.0 ± 1.6	9	8.9 ± 0.3	37.7 ± 1.0	3.1 ± 0.1
T5.9	100	9.8 ± 1.5	29.2 ± 1.7	9	7.5 ± 1.2	51.7 ± 1.3	2.8 ± 0.1
T5 parental	70	5.7 ± 1.0	24.7 ± 1.9	8	5.9 ± 1.2	38.2 ± 1.5	2.3 ± 0.3

Los datos representan la media ± desviación estándar entre todas las clonas para todos los parámetros estudiados. Las abreviaturas de cada parámetro son las mismas cada parámetro de la tabla II. La infectividad fue determinada a las 72 h de incubación. En todos los casos $F > F_{p0.05}$ y $P < 0.05$. Hay variabilidad estadísticamente significativa.

Virulencia e infectividad de las clonas mantenidas en medio de Cultivo LIT

El mantenimiento de las clonas en medio LIT durante un año causó la eliminación de siete de las 11 clonas a lo largo de un año (tabla VI). Además las clonas virulentas que no fueron eliminadas mostraron un cambio en su virulencia e infectividad. Todas ellas fueron menos virulentas. El pico de máxima parasitemia fue menor a 4×10^6 tripomastigotes sanguíneos / mL de sangre y ellas infectaron entre uno y tres órganos por ratón. Los resultados del índice de infección fueron similares a los resultados obtenidos antes de su mantenimiento por un año en medio LIT. La cepa T5 mostró menos virulencia en ratones pero arriba de lo que obtuvieron sus clonas. La cepa T5 mostró menor infectividad que sus clonas más virulentas en ratones, mientras que su infectividad no fue afectada *in vitro*.

Tabla VI. Infectividad de las clonas de la cepa T5 después de haberse mantenido en medio de cultivo LIT durante un año.

Clonas	Virulencia <i>in vivo</i>					Infectividad <i>in vitro</i>	
	Mortalidad (%)	PMP	DMP	IO	MOI	*Porcentaje de células Vero infectadas	*Índice de infección
T5.5	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd
T5.1	0	0.1 ± 0.1	50.7 ± 2.1	1	0.4 ± 0.5	6.5 ± 0.5	2.0 ± 0.1
T5.4	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd
T5.6	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd
T5.3	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd
T5.2	0	3.8 ± 0.6	51.3 ± 3.4	3	1.4 ± 1.1	40.0 ± 1.3	1.9 ± 0.1
T5.7	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd
T5.11	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd
T5.8	0	4.0 ± 0.3	44.5 ± 6.6	3	1.3 ± 1.1	38.3 ± 1.0	2.7 ± 0.1
T5.10	0	4.1 ± 0.3	50.8 ± 4.7	3	1.5 ± 1.2	27.3 ± 2.0	2.7 ± 0.2
T5.9	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd
T5 parental	10	4.0 ± 2.0	40.1 ± 11.9	4	2.1 ± 1.4	33.5 ± 2.6	1.9 ± 0.1

Los datos representan la media ± desviación estándar entre las clones para todos los parámetros. En cada parámetro las abreviaturas son las mismas que en la tabla I. La infectividad fue determinada a las 72 h de incubación. En todos los casos $F > F_{p0.05}$ y $P < 0.05$. Hay una variabilidad estadísticamente significativa. Nd: no determinado debido a que las clonas no produjeron infección en ratón y en cultivos celulares.

Variabilidad antigénica de clonas de *T. cruzi*

Cuando se trató de obtener el patrón antigénico para cada una de las clonas se obtuvo un resultado similar entre cada uno de los carriles (fig.9). Así mismo el patrón antigénico de la cepa es prácticamente igual al de sus clonas. Quizás la diferencia radica en la intensidad de las bandas, sin embargo es la misma cantidad en la misma posición.

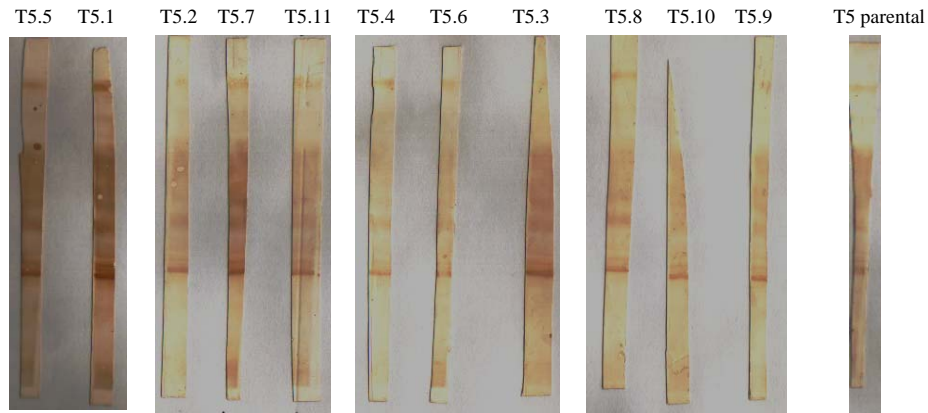


Fig. 9. Patrones antigénicos de las clonas de *T. cruzi* derivadas de la cepa T5. Cada carril corresponde al patrón antigénico de cada clona. Se observa que no hay variabilidad en los patrones antigénicos tanto en las clonas como al compararlas con su cepa parental.

Variabilidad molecular de las clonas de *T. cruzi*

Con la finalidad de ver si las clonas presentaban variabilidad a nivel de su información genética, se realizó la técnica de RAPD (ver material y métodos). El número de bandas observadas para cada clona se contó y de ellas al comparar con otras clonas se obtuvo el índice de similitud de Jaccard (1928) empleando la siguiente ecuación matemática:

$$\text{I.S. Jaccard} = \frac{c}{a+b+c} \times 100$$

Donde **a** es el número de bandas exclusivas de la clona A; **b** es el número de bandas exclusivas de la clona B; y **c** es el número de bandas en ambas clonas.

En la figura 10 se observa el patrón de bandeo con el primer 308. Una vez calculado el índice de similitud comparando las clonas entre sí, los resultados indicaron que se observan 21 bandas, el número máximo de bandas observadas para una clona fue de 19 bandas (clona T5.1) y con menor número (T5.7) con 10 bandas. El menor índice fue de 52.6% y el mayor del 100%. Esto mismo se observó con otros primers, por ejemplo con el del primer F02 (fig.11). Para el caso del primer 306 también se observan índices del 52 al 100% (fig. 12). En la figura 13 se puede observar que al analizar el patrón de las bandas con el primer R9 se lograron identificar 20 bandas (margen izquierdo). La muestra con mayor número de bandas observadas corresponde a la cepa parental T5 con 14 bandas, y las que presentaron el menor número de bandas fueron T5.7 y T5.11 con solo 2 bandas por tanto los índices de similitud variaron de 10 a 90% (en este último caso a la clona T5.1 con la cepa parental (18 de 20 bandas). Por otro lado, en la figura 14 se presenta el resultado del gel en que se corrieron seis clonas con los diferentes oligonucleótidos que se probaron con la finalidad de comparar la variabilidad genética entre ellas.

Cuando se prueba con una sonda marcada radiactivamente estudiando kDNA en el que normalmente se presenta mayor variabilidad genética, se observa que no hay variabilidad (Fig. 15).

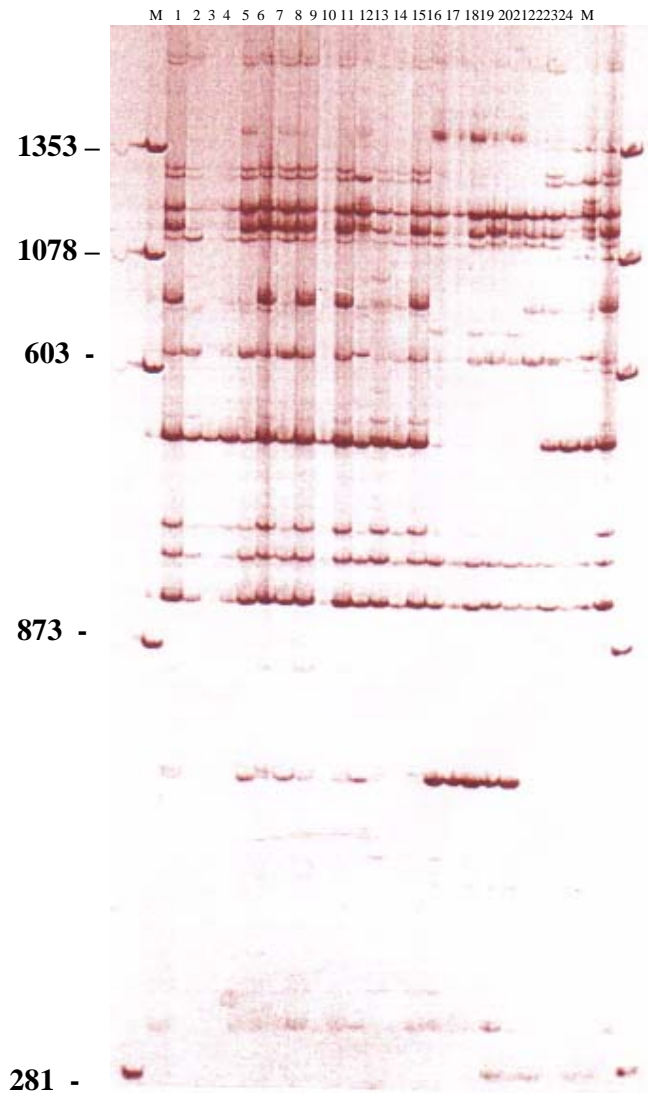


Fig. 10. Patrón de bandeo de las clonas y la cepa parental empleando el primer 308. Cada clona se corrió por duplicado, el primer carril (M) corresponde a los marcadores de peso molecular (Hae III Digest of ϕ X174). Los carriles, de izquierda a derecha tienen las siguientes muestras: cepa parental T5 (carriles marcados con número 1 y 2), T5.5 (3 y 4), T5.1 (5 y 6), T5.4 (7 y 8), T5.6 (9 y 10), T5.3 (11 y 12), T5.2 (13 y 14), T5.7 (15 y 16), T5.11 (17 y 18), T5.8 (19 y 20), T5.10 (21 y 22) y T5.9 (23 y 24). Se observaron 18 bandas en total (presentes o ausentes en cada muestra analizada).

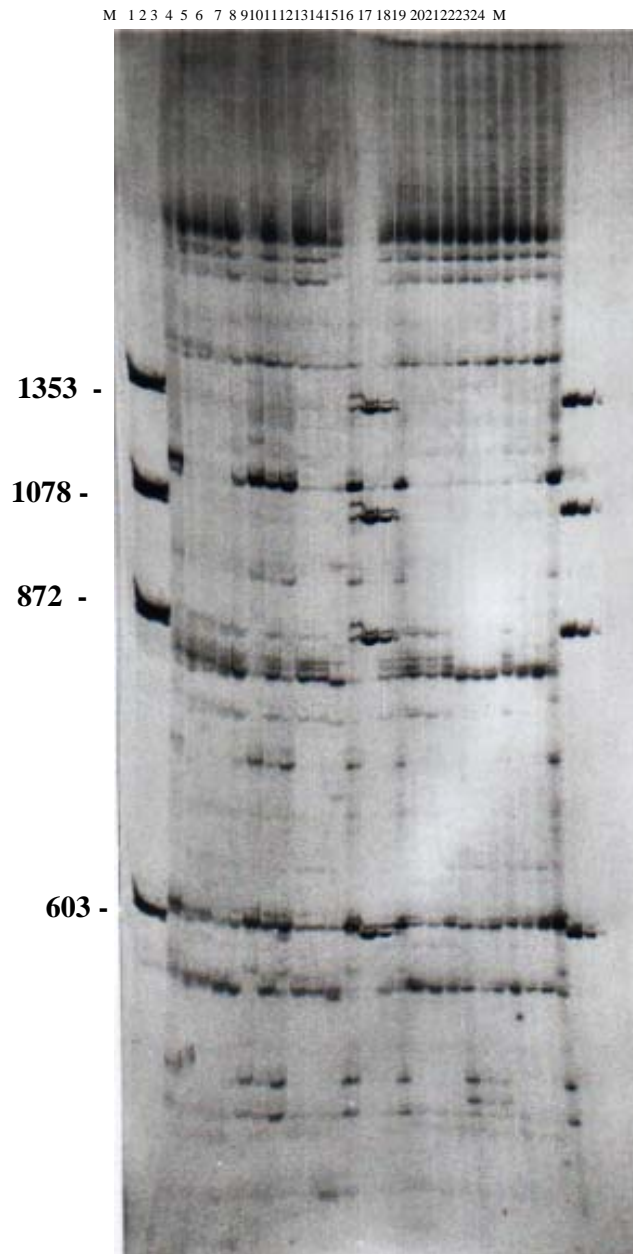


Fig. 11. Patrón de bandeo de las clonas y la cepa parental empleando el primer F02. Cada clona se corrió por duplicado, el primer carril corresponde a los marcadores de peso molecular (M). Los carriles 2 y tres de izquierda a derecha corresponden a la cepa parental T5, T5.5 (3 y 4), T5.1 (5 y 6), T5.4 (7 y 8), T5.6 (9 y 10), T5.3 (11 y 12), T5.2 (13 y 14), T5.7 (15 y 16), T5.11 (17 y 18), T5.8 (19 y 20), T5.10 (21 y 22) y T5.9 (23 y 24). Sólo se pueden observar cuatro marcadores de peso molecular (hasta 603 pb) las restantes de menor peso molecular no se

observan debido a que las bandas que se lograron ver e indicaron un mejor resultado fueron de alto peso molecular. Se lograron identificar 19 bandas. La clona con mayor número de bandas observadas fue la T5.7 con 19 bandas, y la clona con menor bandas es con 10 bandas (T5.8 y T5.10), por tanto los índices de similitud varió del 52.6 y 100%.

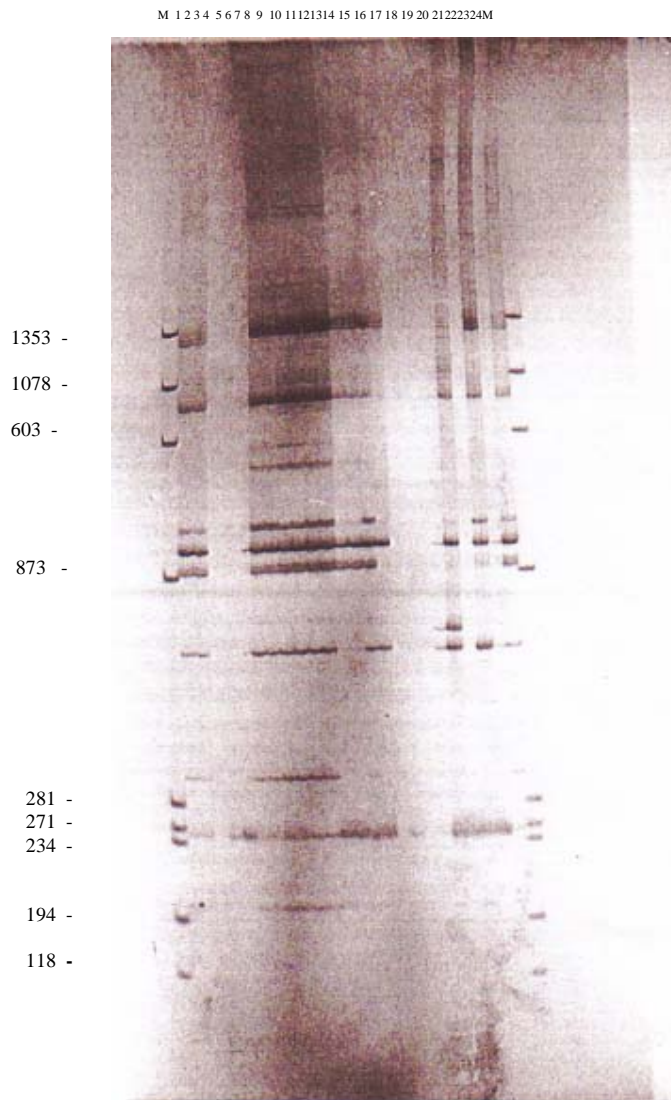


Fig. 12. Patrón de bandeado de las clonas y la cepa parental empleando el primer 306. Cada clona se corrió por duplicado, el primero y último carriles corresponden a los marcadores de peso molecular (M). Los carriles 2 y 3 de izquierda a derecha corresponden a la cepa parental T5, T5.5 (3 y 4), T5.1 (5 y 6), T5.4 (7 y 8), T5.6 (9 y 10), T5.3 (11 y 12), T5.2 (13 y 14), T5.7 (15 y

16), T5.11 (17 y 18), T5.8 (19 y 20), T5.10 (21 y 22) y T5.9 (23 y 24). Sólo se pueden observar cuatro marcadores de peso molecular (hasta 603 pb) las restantes de menor peso molecular no se observan debido a que las bandas que se lograron ver e indicaron un mejor resultado fueron de alto peso molecular). Se lograron identificar 19 bandas. La clona con mayor número de bandas observadas fue la T5.7 con 19 bandas, y la clona con menor bandas es con 10 bandas (T5.8 y T5.10), por tanto los índices de similitud varió del 52.6 y 100%.

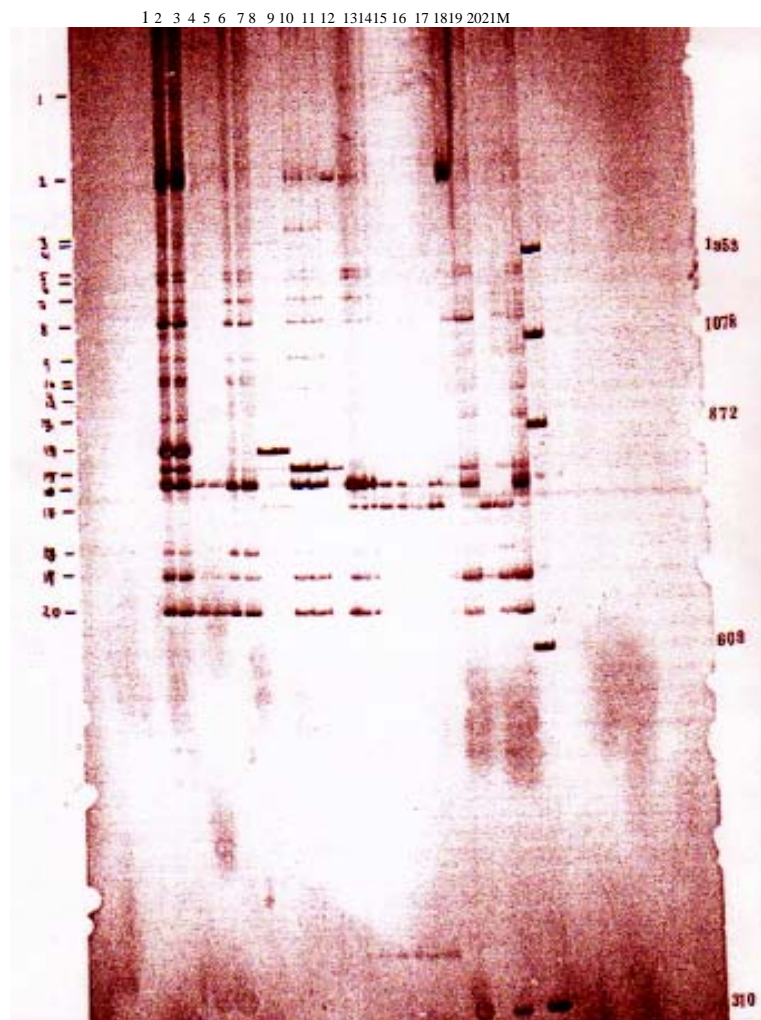


Fig. 13. Patrón de bande de las clonas y la cepa parental empleando el primer R9. Cada clona se corrió por duplicado, el último carril corresponde a los marcadores de peso molecular (M). Las muestras se colocaron en los carriles en el siguiente orden de izquierda a derecha: La cepa parental T5 se colocó en los carriles 1 y 2, la clona T5.5 (3 y 4), T5.1 (5 y 6), T5.4 (7 y 8), T5.6 (9 y 10), T5.3 (11), T5.2 (12 y 13), T5.7 (14 y 15), T5.11 (16 y 17), T5.8 (18), T5.10 (19 y

20) y T5.9 (21). Sólo se pueden observar 5 marcadores de peso molecular (hasta 310 pb) las restantes de menor peso molecular no se observan debido a que las bandas que se lograron ver e indicaron un mejor resultado fueron de alto peso molecular).

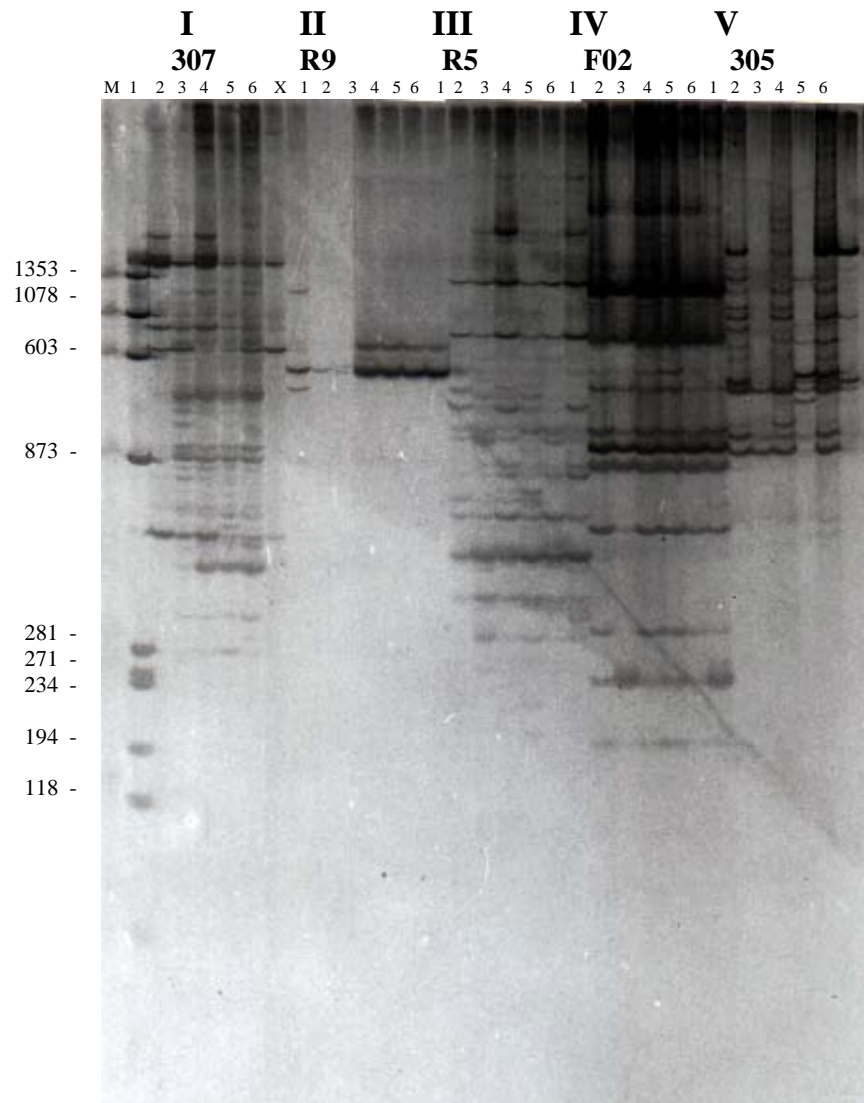


Fig. 14. Patrones de bandeo de cinco clonas y la cepa parental T5. Carril con marcadores de peso molecular (M). Las muestras de clonas y cepa parental se corrieron electroforéticamente después de ser amplificadas con 5 primers. Los carriles en cada primer corresponden a las siguientes muestras: 1 (cepa parental T5), 2 (T5.1), 3(T5.5), 4 (T5.10), 5 (T5.9), 6 (T5.8).

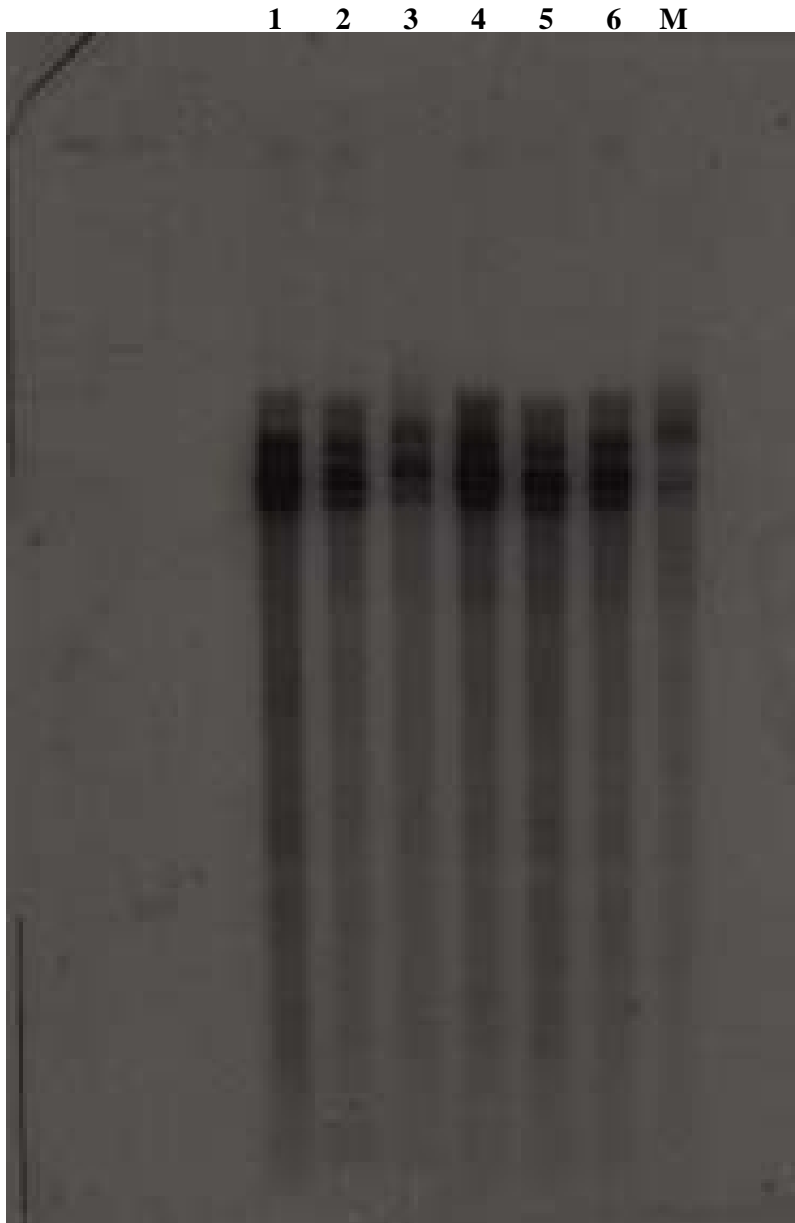


Fig.15. Patrón de bandeo de las clonas y la cepa parental empleando la sonda pRTC81.

Cada clona se corrió una sola vez, el último carril a la derecha corresponde a los marcadores de peso molecular.

Determinación de asociación de variables de virulencia y moleculares. Mediante la prueba estadística de Mantel - Hanszel se comparó los resultados de virulencia, infectividad y patrones por RAPD empleando los resultados convirtiéndolos en matrices para poderlos comparar y saber

si presentaban alguna asociación. En la tabla VII se observan los resultados. Se puede ver que no hay asociación considerable entre las diferentes variables, no obstante se observa (en subrayado) que las variables de mayor asociación son las correspondientes a número de órganos y amastigotes en corazón y la infectividad en células Vero con mortalidad. Los patrones moleculares no tienen asociación alguna.

Tabla VII. Índice de correlación entre las diferentes variables biológicas y moleculares.

	Mortalidad	Parasitemia	No. órganos	Amastigotes	% Células Vero infectadas	Índice de infección
Parasitemia	0.4334					
No. órganos infectados	<u>0.65911</u>	0.14666				
Nidos de amastigotes en corazón	<u>0.63338</u>	0.27672	0.44246			
% Células Vero infectadas	<u>0.63516</u>	0.36105	0.23617	0.33542		
Índice de infección	0.14157	-0.0383	0.07087	0.004	-0.085	
RAPD-PCR	0.33402	0.22027	0.25983	0.03114	0.28218	0.01487

DISCUSIÓN

Un fenómeno interesante en la enfermedad de Chagas es la variabilidad de manifestaciones clínicas que se llegan a presentar en la infección humana, que varía desde la asintomatología hasta los casos de problema severos a nivel cardiovascular y/o gastrointestinal o hasta la muerte. Por otro lado la variación clínica de la enfermedad de Chagas también cambia de región en región. ¿Cuáles son las razones para que se presente esta variabilidad clínica? Es algo que aún no encuentra una respuesta. Sin embargo hay varias posibles explicaciones que tienen que ver con las características genéticas e inmunológicas del huésped (Marinho y cols., 2004; Postan y cols., 1987); Por ejemplo, las moléculas del complejo principal de histocompatibilidad marcador inmunológico para el reconocimiento antigénico puede estar involucrado en la susceptibilidad o resistencia del huésped, como fue demostrado por Andrade y colaboradores quienes trabajaron con las clonas Coll.72 y JG de *T. cruzi* y utilizando ratones de cepas singénicas BALB/c, DBA-2 y c57Black/6 y la cepa congénica Swiss, mostrando susceptibilidad en las dos primeras cuyo haplotipo es H-2, distinto del tercero (Andrade y cols., 2002; Andersson y cols., 2003); pero esta variación se debe principalmente a factores relacionados con el parásito (Macedo y Pena, 1998). Muchas cepas de *T. cruzi* han sido caracterizadas a través de experimentos *in vitro* mediante cultivos axénicos y cultivos celulares e *in vivo* en animales de experimentación en que se han determinado diferentes grados de virulencia e infectividad entre ellas. El porqué de esta variabilidad en el comportamiento de las cepas, también es otra cuestión sin responder. Sin embargo, se piensa que podría deberse a cambios genéticos y por consiguiente en el comportamiento. Pero otra explicación es que una cepa esté constituida por múltiples clonas (Engel y cols., 1982; Andrade y cols., 1999; Buscaglia y Di Noia, 2003), cada una con diferentes características tanto moleculares como en el comportamiento que se manifiesta en el huésped, incluyendo al humano (Lana, 1996); de este modo el comportamiento de una cepa es el

resultado de la mezcla de las clonas que la constituyen. Un ejemplo de dicha variabilidad, en que una cepa presenta en su comportamiento a través del tiempo, es el primer caso de enfermedad de Chagas: en una paciente de nombre Berenice se demuestra la presencia de trypanosomas en sangre, después de varias décadas, en 1962 y en 1978 se demuestra diferencias entre estas dos clonas lo que demuestra infección mixta.

Una cepa puede cambiar en su composición clonal cuando pasa de un ambiente a otro (Deane y cols., 1984; Devera y cols., 2003). De esta manera un huésped puede estar infectado con un número limitado de clonas y aquél actúa como filtro clonal de *T. cruzi*, es decir, puede contener una comunidad de parásitos, sin embargo es probable que una nueva presión de selección de clonas sea impuesta por nuevas condiciones ambientales las que influyen en la sobrevivencia de los parásitos (Deane y cols., 1984). Cuando las cepas de *T. cruzi* son transmitidas a los humanos mediante las heces de los triatomíneos, las clonas pueden ser seleccionadas, así cada especie de triatomíneo es infectado por diferentes poblaciones de *T. cruzi*. En regiones donde hay una cantidad grande de triatomíneos como lo es México con 32 especies, la variabilidad de las cepas es una situación interesante y por ende encontrar cepas mono o multiclonales; y sin embargo pueden predominar algunas de las clonas e indicar el ciclo de transmisión más frecuentemente observado en esa zona (Breniere y cols., 1989).

En este trabajo, por primera vez se demuestra la existencia de cepas mono y multiclonales de *T. cruzi* aisladas en México a partir de triatomíneos, demostrando variabilidad clonal mediante el comportamiento en cultivos celulares y la virulencia e infectividad en ratones de experimentación.

Solamente la cepa T5 resultó ser policlonal. También se pudo demostrar que el triatomíneo no fue un factor que influyera en la poli o monoclonalidad del parásito. Podemos pensar en que la probabilidad de encontrar poblaciones multiclonales del parásito es mayor en huéspedes invertebrados que en el huésped vertebrado, ya que necesitan alimentarse varias veces para

completar su ciclo de vida, en cambio el huésped vertebrado transportará una cepa multiclonal rara vez a menos que sea transmitido por un triatomino que ya lleva una cepa multiclonal. En un triatomino, las fases más avanzadas como son los adultos tienen mayor probabilidad de tener cepas multiclonales que cepas monoclonales, ya que la fase adulta obtiene sangre en al menos cinco ocasiones para completar su ciclo biológico. Esta es la razón por la cual en este estudio se escogió aislar clones de cepas a partir de triatominos en fase adulta. Sin embargo, de acuerdo a los resultados, este es un evento al azar que ocurre en la naturaleza pues solo una de seis cepas resultó multiclonal.

El comportamiento de la cepa T5 antes de su clonación es el resultado de las clonas que la componen y que predominan en dicho comportamiento, tal como fue sugerido por Campos y Andrade (1996) y Campos y colaboradores (1999), quienes observaron que la cepa 21 SF mostró un comportamiento que fue dado por algunas clonas que predominaron en la misma cepa y que rigen el comportamiento de la misma y que es sugerido por otros autores como Andrade y colaboradores (1999). Camandoroba y colaboradores demostraron que las siete clonas de la cepa Colombiana muestran homogeneidad fenotípica y que posiblemente la misma clona sea la que predomina en esa región donde se aisló la cepa, pero cuatro clonas mostraron alta parasitemia y alta mortalidad producida a ratones, mientras que tres clonas fueron de baja infectividad y virulencia (Camandoroba y cols., 2001). En el caso de las clonas de la cepa T5, las clones virulentas de la cepa T5 predominaron sobre las no virulentas lo cual caracteriza a la cepa parental T5 como una cepa virulenta.

Es importante señalar que las clonas que infectaron mayor número de órganos fueron aquellas que produjeron mayor parasitemia en los ratones infectados. Podríamos pensar en que esto se debe al resultado de la reproducción intracelular de *T. cruzi* en el huésped vertebrado de acuerdo a su ciclo biológico en que se involucra a la fase intracelular del parásito, en este caso el amastigote (Brener, 1973; Burleigh y Andrews, 1995).

No obstante que la virulencia e infectividad en ratones y en cultivos celulares fue similar para cada cepa de *T. cruzi* y sus clonas, no podemos generalizar diciendo que esto siempre sucede o que están relacionados, sino que es un evento al azar, ya que en otros estudios se demuestra que la infectividad en ratones no está relacionado con la infectividad en cultivos celulares, lo cual fue demostrado por Toma y colaboradores (2000); sin embargo es importante señalar que ellos trabajaron con cepas no clonadas y que posiblemente sus cepas sufrieron selección clonal de manera que las clonas que integraban la cepa cuando infectaron ratones fueron distintas a cuando infectaron los cultivos celulares.

Respecto a la estabilidad en el comportamiento de *T. cruzi*, se considera que las cepas del parásito se encuentran en equilibrio después de varios pases en el laboratorio, pues ya ha ocurrido selección clonal por lo que su población puede ser mono o multiclonal, pero con una cantidad constante de ellas y con un comportamiento similar o idéntico entre cada pase, ya sea *in vitro* o *in vivo* y que han alcanzado dicha estabilidad cuando las clonas han sido seleccionadas por las condiciones ambientales que actúan como filtros (Campos y cols. 1999; Tibayrenc y Ayala, 1988; Bosseno y cols., 2002; Pérez, 2006). Lo anterior se pudo demostrar cuando las subclonas derivadas de cada clona no mostraron variabilidad en su comportamiento entre las mismas subclonas derivadas de una clona sugiriendo que después de una clonación han alcanzado la estabilidad; esta es la razón por la cual consideramos que no fue necesario realizar una nueva clonación.

Es importante enfatizar que de acuerdo a nuestros resultados, cuando los parásitos son mantenidos durante varios meses bajo las mismas condiciones y han mostrado un comportamiento constante, sus características han alcanzado la estabilidad tal como es descrito en otros trabajos (Brener y cols., 1973; Campos y Andrade, 1996), pues en este trabajo el comportamiento de cada clona fue similar durante el mantenimiento en ratones a lo largo de un año. Sin embargo no podemos asegurar que durante el cambio a nuevas condiciones el

comportamiento regrese a ser el mismo pues habrá otro filtro que podría nuevamente seleccionar las clonas.

Otro dato importante que se pudo observar en este trabajo fue lo relacionado con el comportamiento de las clonas y subclonas después de su mantenimiento a lo largo de un año en ratones. Algunas de las clonas mantenidas durante un año en ratones aumentaron su virulencia mientras que otras fueron eliminadas o su virulencia fue atenuada. Esto ha sido observado en otros trabajos. Por ejemplo, las clonas obtenidas a partir de la cepa Colombiana aumentaron su virulencia a lo largo de varios pases en ratón (Camandaroba y cols., 2001); Chia-Tung Pan también demostró incremento de la virulencia en las clonas después del mantenimiento durante ocho pases en ratones CD-1 y la virulencia fue baja cuando ellas fueron mantenidas en medio de cultivo (Chia-Tung, 1982). Por otro lado, el mantenimiento de los parásitos en cultivos durante tiempos prolongados contribuyó a la atenuación de la virulencia (Menezes, 1968) y algunos de los parásitos fueron eliminados. En este trabajo, el mantenimiento de las clonas en medio de cultivo LIT durante un año ocasionó la eliminación de siete de las once clonas, es decir más del 50% de ellas. En otros trabajos se ha presentado eliminación de los parásitos cuando se clonan (Miles, 1975; Goldberg y Chiari, 1980; Wittner y cols., 1982). Definitivamente el ambiente donde se encuentran los parásitos es un factor que induce, activa o favorece la diferenciación de *T. cruzi* a un microorganismo con mayor o menor capacidad patogénica, por ejemplo Villalta y Kierszenbaum (1987) demostraron que cuando cepas de *T. cruzi* derivadas de triatominos como *Rhodnius prolixus* son más infectivas que aquella que se han mantenido en cultivos axénicos (Villalta y Kierszenbaum, 1987). Todas estas observaciones no tienen una explicación totalmente satisfactoria, quedan en posibles suposiciones, lo que hace pensar que faltan más estudios por realizar.

Otra posible explicación a todas estas causas está en relación a la expresión de varias proteínas involucradas en la atenuación de la virulencia del parásito (Duschak et al., 2001).

Además que la variabilidad tiene que ver desde un nivel molecular, la expresión de moléculas de superficie que hacen susceptible a un huésped para ser infectado por *T. cruzi* pues pueden existir glicoproteínas de superficie que permiten la unión a algunas clonas del parásito que tengan moléculas receptoras y que son afines solo a esas moléculas de superficie de la célula huésped. (Doyle y cols., 1984).

Otro aspecto importante que se demostró está relacionado con la variabilidad antigénica y molecular. Antigénicamente se observó nula variabilidad, lo cual indica que fenotípicamente su expresión antigénica no difiere entre las diferentes clonas que componen la cepa T5; no obstante en virulencia si hay variabilidad, lo cual conduce a pensar que el poder patogénico de *T. cruzi*, no está en función de su capacidad antigénica, de aquí que en las pruebas de diagnóstico no varíen mucho las diferentes pruebas que se estandarizan, sino más bien, la virulencia radica o está en función de otras moléculas que expresa el parásito, posiblemente intracelulares (secretadas y/o excretadas). A nivel molecular podemos ver que por RAPD en la mayor parte de los primers usados se observó poca variabilidad genética lo cual significa que no presentan mucha variación entre ellas; sin embargo finalmente en dos primers se pudo observar variabilidad entre ellas en un porcentaje del 55 al 65%. Tal vez las regiones genéticas amplificadas estén relacionadas con el comportamiento de las clonas demostrando variabilidad en la virulencia.

En México se han realizado varios estudios sobre caracterización de cepas de *T. cruzi* aisladas de diferentes regiones del país, sin embargo no se han clonado; los resultados sobre la caracterización de estas cepas sin clonar han mostrado alta variabilidad en el comportamiento de las cepas en ratón (Lopez-Olmos y cols., 1998; Espinoza y cols., 1998; Cárdenas y cols., 1975; Zavala-Castro y cols., 1992), quizás debido a que estén compuestas por más de una clona y los resultados finales podrían explicarse señalando que el comportamiento final se debió a la presencia de clonas que predominaron en esas cepas, o bien las cepas eran monoclonales y el comportamiento ya era estable; o la otra explicación es que dicha variabilidad es una

desestabilización constante del comportamiento de las cepas debido a que las cepas con el tiempo cambian la composición clonal o se desestabilizaban.

Los hallazgos de este trabajo de investigación apoyan la idea de la existencia de clonas principales que circulan en áreas endémicas de México y que conducen a un predominio entre las diferentes clonas que pudiesen haber en la naturaleza y que originan un comportamiento general de una cepa determinada y posiblemente origine a su vez un cuadro clínico específico para una persona infectada con *T. cruzi*, en otras palabras, la variabilidad clonal, más que la de cepas es la causante de la variabilidad en las manifestaciones clínicas de la enfermedad de Chagas. Además es importante señalar que no necesariamente una clona es responsable del cuadro clínico de un paciente infectado, puede ser que una persona esté infectada por una mezcla de clonas y ellas conduzcan a un resultado clínico que podría ser distinto a cuando una persona esté infectada por una clona solamente (Lauria-Pires y cols., 1996; Lana y cols., 2000). Una repercusión clínica de esta variabilidad clonal es la terapéutica pues es bien demostrado que los medicamentos actúan de distinto modo para cada clona (Campos y cols., 2005). De este modo, este trabajo da pauta para continuar con los trabajos sobre la caracterización de *T. cruzi* y se sugiere que sea a nivel clonal antes de querer caracterizar a *T. cruzi*.

Otro aspecto importante relacionado con el comportamiento biológico de *T. cruzi* está relacionado con su divergencia filogenética, pues poblaciones más distantes genéticamente muestran mayor distancia en relación a sus propiedades biológicas (Toledo y cols., 2002); esto nos hace pensar que de acuerdo a su adaptación a través del tiempo su comportamiento se ve afectado y se va favoreciendo la infectividad y virulencia o disminuyendo estas propiedades.

CONCLUSIONES

1. En la naturaleza una cepa de *T. cruzi* puede estar compuesta de una o varias clonas que presentan diferente comportamiento, así como virulencia e infectividad.
2. Con el tiempo las clonas uniformizan su comportamiento ya sea a una atenuación o aumento en su virulencia.
3. A nivel antigénico y molecular a través del análisis de DNA las clonas presentan las mismas características.
4. Los patrones antigénicos y moleculares no están relacionados entre sí, son variables independientes.
5. No hay asociación entre las diferentes variables biológicas.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Aguirre, PE. 1947. Presencia de *Trypanosoma cruzi* en mamíferos y triatomídeos de Monterrey, Nuevo León, México. *Arch Med Mex* 5: 350-358.
2. Amorim DS, Manço JC, Gallo JrL, Marin NJA. 1979. Clínica forma crónica cardíaca. In: *Trypanosoma cruzi* e Doença de Chagas. Editora: Guanabara Koogan. Rio de Janeiro, Brasil. Pp. 265-311.
3. Andersson J, Orn A, Sunnemark D. 2003. Chronic murine Chagas' disease: the impact of host and parasite genotypes. *Immunol Lett* 86:207-12.
4. Andrade LO, Machado CR, Chiari E, Pena SD, Macedo AM. 1999. Differential tissue distribution of diverse clones of *Trypanosoma cruzi* in infected mice. *Mol Biochem Parasitol*. 100:163-172.
5. Andrade LO, Machado CR, Chiari E, Pena SD, Macedo AM. 2002. *Trypanosoma cruzi*: role of host genetic background in the differential tissue distribution of parasite clonal populations. *Exp Parasitol* 100:269-275.
6. Apt W, Aguilera X, Arribada A, Gomez L, Miles MA, Widmer G. 1987. Epidemiology of Chagas' disease in northern Chile: isozyme profiles of *Trypanosoma cruzi* from domestic and sylvatic transmission cycles and their association with cardiopathy. *Am J Trop Med Hyg*. 37:302-307.
7. Barata, JMS. 1981. Aspectos morfológicos de Ovos de Triatominae II. Características macroscópicas e exocoriais de dez espécies do género *Rhodnius* (Stal, 1859) (Hemiptera-Reduviidae). *Rev Saude Pub* 15:490-542.
8. Becerril, FMA, 2008. Parasitología médica: de las moléculas a la enfermedad. Ed. McGraw Hill-Interamericana. 2ª ed. México DF. Pp 301.
9. Bice DE, Zeledón R. 1970. Comparison of infectivity of strains of *Trypanosoma cruzi* (Chagas, 1909). *J Parasitol* 56:663-670.

10. Bosseno MF, Barnabé Ch, Magallón GE, Lozano KF, Ramsey J, Espinoza B, Breniere SF. 2002. Predominance of *Trypanosoma cruzi* lineage I in Mexico. *J Clin Microbiol* 40:627-632.
11. Brener Z. 1973. Biology of *Trypanosoma cruzi*. *Ann Rev Microbiol* 27:347-382.
12. Brener Z, Andrade ZA. 1979. *Trypanosoma cruzi* e Doença de Chagas. Editora: Guanabara Koogan. Rio de Janeiro, Brasil. Pp. 1-462.
13. Brener Z. 1980. Immunity to *Trypanosoma cruzi*. In: WHR Lumsden, R. Muller and JR Baker (eds). *Advances in Parasitology*. Academic Press, New York. 247-292.
14. Brener, Z. 1987. Pathogenesis and immunopathology of chronic Chagas disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 82:205-212.
15. Brenier SF, Carrasco R, Revollo S, Aparicio G, Desjeux P, Tibayrenc M. 1989. Chagas' disease in Bolivia: clinical and epidemiological features and zymodeme variability of *Trypanosoma cruzi* strains isolated from patients. *Am J Trop Med Hyg* 41:521-529.
16. Breniere SF, Bosseno MF, Telleria J, Bastrenta B, Yacsik N, Noireau F, Alcazar JL, Barnabé Ch. 1998. Different behavior of two *Trypanosoma cruzi* major clones: transmission and circulation in young bolivian patients. *Exp Parasitol* 89:285-295.
17. Brump E. 1914. O xenodiagnóstico. Aplicação ao diagnóstico de algumas infecções parasitárias e, em particular, à tripanosomose de Chagas. *An Paul Med Cirurg* 3:97-102.
18. Burleigh B, Andrews NW. 1995. The mechanisms of *Trypanosoma cruzi* invasion of mammalian cells. *Annu Rev Microbiol* 49:175-200.
19. Buscaglia CA, Di Noia JM. 2003. *Trypanosoma cruzi* clonal diversity and the epidemiology of Chagas' disease. *Microbes Infect* 5:419-427.
20. Camandoroba ELP, Campos RF, Magalhaes JB, Andrade SG. 2001. Clonal structure of *Trypanosoma cruzi* Colombian strain (biodeme type III): biological, isoenzymic and histopathological analysis of seven isolated clones. *Rev Soc Bras Med Trop* 34:151-157.

21. Camargo E. 1964. Growth and differentiation in *Trypanosoma cruzi*: Origino of metacyclic trypanosoma in liquid media. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 6:93.
22. Campos RMF, Andrade SG. 1996. Characterizations of subpopulations (clones and subclones) of the 21 SF strain of *Trypanosoma cruzi* after long lasting maintenance in the laboratory. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 91:795-800.
23. Campos RF, Goncalves MS, Dos Reis EAG, Dos Reis MG, Andrade SG. 1999. comparative analysis by polymerase chain reaction amplified minicircles of kinetoplast DNA of a stable strain of *Trypanosoma cruzi* from Sao Felipe, Bahia, its clones and subclones: possibility of predominance of a principal clone in this area. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 94:23-29.
24. Campos RF, Guerreiro MLS, Sobral KSC, Lima RCPC, Andrade SG. 2005. Response to chemotherapy with benznidazole of clones isolated from the 21 SF strain of *Trypanosoma cruzi* (biodeme type II, *Trypanosoma cruzi* II). *Rev Soc Bras Med Trop* 38:142-146.
25. Cárdenas RL, Tay J, Salazar SPM. 1975. Cambios histopatológicos producidos en el ratón por cepas mexicanas de *Trypanosoma cruzi*. *Rev Inv Salud Púb (Mex)*.35:131-153.
26. Chagas C. 1909. Nova tripanozomiazze humana. Estudos sobre a morfologia e ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. Gen., n.sp., agente etiolojico de nova entidade morbida do homen – Ueber eine neue Trypanosomiasis des Menschen. Studien über Morphologie und Entwicklungszyklus des *Schizotrypanum cruzi* n. Gen. , n. sp., Erreger einer neuen Krankheit des Menschen. *Mem Inst Oswaldo Cruz* I:159-218.
27. Chao A, Chazdon RL, Colwell RK, Shen TJ. 2005. A new statistical approach for assesing similarity of species composition with incidence and abundance data. *Ecol Letters* 8:148-159.

28. Chia-Tung Pan. 1978. *Trypanosoma cruzi*: Intracellular stages grown in a cell-free medium at 37°C. *Exp Parasitol* 45:215-224.
29. Chia-Tung Pan. 1982 Establishment of clones of *Trypanosoma cruzi* and their characterization *in vitro* and *in vivo*. *Bull World Health Org* 60:101-107.
30. Daniel, WW. 1999. Bioestadística. Base para el análisis de las ciencias de la Salud, 3a ed. Editorial Limusa, grupo Uthea, Noriega editores, México, 878 p.
31. De Michelli A, 1993. Trayectoria de la electrocardiografía Mexicana. *Arch Inst Cardiol Mex* 63: 259–266.
32. Deane, MPR, Mangia HR., Pereira NM, Momen H, Goncalves AM, Morel CM. 1984. *Trypanosoma cruzi*: strain selection by different schedules of mouse passage of an initially mixed infection. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 79:495-497.
33. Devera R, Fernandes O, Rodrigues CJ. 2003. Should *Trypanosoma cruzi* be called “cruzi” complex? A review of the parasite diversity and the potential of selecting population after *in vitro* culturing and mice infection. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 99: 1-12.
34. Dias Neto E, Steindel M, Passos LK, Souza CP, Rollinson D, Katz N, Romanha AJ, Pena SD, Simpson AJ. 1993. The use of RAPDs for the study of the genetic diversity of *Schistosoma mansoni* and *Trypanosoma cruzi*. *EXS* 67:339-345.
35. Doyle PS, Dvorak JA, Engel JC. 1984 *Trypanosoma cruzi*: quantification and analysis of the infectivity of cloned stocks. *J Protozool* 31:280-283.
36. Duschak, VG, Ciaccio M, Nassert JR, Bassombrio MA. 2001. Enzymatic activity, protein expression, and gene sequence of cruzipain in virulent and attenuated *Trypanosoma cruzi* strains. *J Parasitol* 87: 1016-1022.
37. Dvorak JA, Hyde TP. 1973. *Trypanosoma cruzi*: Interaction with vertebrate cells *in vitro*. I. Individual interactions at the cellular and subcellular levels. *Exp. Parasitol* 34:268-283.

38. Dvorak JA. 1984. The natural heterogeneity of *Trypanosoma cruzi*: biological and medical implications. *J Cell Biochem* 24:357-371.
39. Engel JC, Dvorak JA, Segura EL, Crane MSJ. 1982. *Trypanosoma cruzi*: Biological characterization of 19 clones derived from two chronic chagasic patients. I. Growth kinetics in liquid medium. *J Protozool* 29:555-560.
40. Espinoza B, Vera-Cruz JM, González H, Ortega E, Hernández R. 1998. Genotype and virulence correlation within Mexican stocks of *Trypanosoma cruzi* isolated from patients. *Acta tropica* 70:63-72.
41. Fernandes O, Santos SS, Junqueira ACV, Jansen AM, Cupolillo E, Campbell DA, Zingales B, Coura JR. 1999. Populational heterogeneity of Brazilian *Trypanosoma cruzi* isolates revealed by the mini-exon and ribosomal spacers. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 94 (suppl. 1):195-197.
42. Garzon E, Genna F, Bosseno MF, Simony-La Fontaine J, Radal M, Sereno D, Mathieu-Daude F, Ouaisi A, Breniere SF. 2005. Differential infectivity and immunopathology in murine experimental infections by two natural clones belonging to the *Trypanosoma cruzi* I lineage. *Parasitol* 131 (Pt):109-119.
43. Goldberg SS, Chiari E. 1980. Growth and isolation of single colonies of *Trypanosoma cruzi* on solid medium. *J Parasitol* 66:677-679.
44. Goldberg SS, Pereira AAS. 1983. Enzyme variation among clones of *Trypanosoma cruzi* *J Parasitol* 69:91-96.
45. Gomes ML, Araujo SM, Chiari E. 1991. *Trypanosoma cruzi*: Growth of clones on solid medium using culture and blood forms. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 86:131-132.
46. Guzmán BC. 2001. Epidemiology of Chagas disease in Mexico: an update. *TRENDS in Parasitol* 17: 372-376.

47. Hernández R, Herrera J, Bosseno MF, Breniere SF, Espinoza B. 2001. *Trypanosoma cruzi*: data supporting clonality in Mexican stocks. *J Parasitol* 87:1178-1181.
48. Hoffman CC. 1928. Nota acerca de un probable transmisor de la trypanosomiasis humana en el Estado de Veracruz. *Rev Mex Biol* 8(1):12-18.
49. Lambrecht FL. 1965. Biological variations in trypanosomes and their relation to the epidemiology of Chagas' disease. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 7:346-352.
50. Lana M, Chiari CA, Chiari E, Morel CM, Goncalves AM, Romanha AJ. 1996. Characterization of two isolates of *Trypanosoma cruzi* obtained from the patient Berenice, the first human case of Chagas' disease describe by Carlos Chagas in 1909. *Parasitol Res* 82:257-260.
51. Lana M, Pinto AS, Bastrenta B, Barnabé C, Noël S, Tibayrenc M. 2000. *Trypanosoma cruzi*: Infectivity of clonal genotype interactions in acute and chronic phases in mice. *Exp Parasitol* 96:61-66.
52. Lauria-Pires L, Bogliolo AR, Teixeira RL. 1996. Diversity of *Trypanosoma cruzi* stocks and clones derived from chagas disease patients. II. Isozyme and RFLP characterizations. *Exp Parasitol* 82: 182-190.
53. Lent H, Wygodzinsky P. 1979. Revision of the triatominae (Hemiptera, Reduviidae), and their significance as vectors of Chagas' disease. *Bull Amer Mus Nat Hist* 163:124-520.
54. Levine y cols. 1980. A newly revised classification of the protozoa. *J protozool* 271:37-58.
55. Lima MT, Jansen AM, Rondinelli E, Gatas CR. 1990. *Trypanosoma cruzi*: properties of a clone isolated from CL strain. *Parasitol Res* 77:77-81.
56. López-Olmos V, Pérez-Nasser N, Piñero D, Ortega E, Hernández R, Espinoza B. 1998. Biological characterization and genetic diversity of Mexican isolates of *Trypanosoma cruzi*. *Acta Tropica* 69:239-254.

57. Macedo AM, Pena SDJ. 1998. Genetic variability of *Trypanosoma cruzi*: Implications for the pathogenesis of Chagas disease. *Parasitol Today* 14:119-124.
58. Macedo AM, Machado CR, Oliveira RP, Pena SDJ. 2004. *Trypanosoma cruzi*: genetic structure of populations and relevance of genetic variability to the pathogenesis of Chagas disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 99:1-12.
59. Marinho CR, Bucci DZ, Dagli ML, Bastos KR, Grisotto MG, Sardinha LR, Baptista CR, Goncalves CP, Lima MR, Alvarez JM. 2004. Pathology affects different organs in two mouse strains chronically infected by a *Trypanosoma cruzi* clone: a model for the genetic studies of Chagas' disease. *Infect Immun* 72:2350-2357.
60. Mazzotti L. 1940 Dos casos humanos de enfermedad de Chagas en el estado de Oaxaca. *Gac Med Mex* 70:417-420.
61. Medina – Acosta E, Cross G. 1993. Rapid isolation of DNA from trypanosomatid protozoa using a simple “mini-prep” procedure. *Mol Biochem Parasitol* 59:327-330.
62. Melo RC, Brener Z. 1978. Tissue tropism of different *Trypanosoma cruzi* strains. *J parasitol* 64:475-482.
63. Menezes, H. 1968. Protective effect of an avirulent (cultivated) strain of *Trypanosoma cruzi* against experimental infection in mice. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 10: 1-4.
64. Miles MA. 1975. Cloning *Trypanosoma cruzi*. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg* 68:256.
65. Miles MA, Toyé PJ, Oswald SC, Godfrey DG. 1977. The identification by isozyme patterns of two distinct strain-groups of *Trypanosoma cruzi*, circulating independently in a rural area of Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 71:217-225.
66. Miles MA, Souza AA, Povia MM, Shaw JJ, Lainson R, Toyé PJ. 1978. Isozymic heterogeneity of *Trypanosoma cruzi* in the first autochthonous patients with Chagas' Disease in Amazonian Brazil. *Nature* 272:819-821.

67. Morel C, Chiari E, Camargo EP, Mattei DM, Romanha AJ, Simpson L. 1980. Strains and clones of *Trypanosoma cruzi* can be characterized by pattern of restriction endonuclease products of kinetoplast DNA minicircles. *Proc Natl Acad Sci USA* 77:6810-6814.
68. Morel CM. 1999. Chagas disease, from discovery to control – and beyond: history, myths and lessons to take home. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 94 suppl. 1:3-16.
69. Murta SMF, Romanha AJ. 1999. Characterization of *Trypanosoma cruzi*. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 94 suppl. 1:177-180.
70. Nunes LR, De Carvalho MRC, Buck GA. 1997. *Trypanosoma cruzi* strains partition into two groups based on the structure and function of the spliced leader RNA and rRNA gene promoters. *Mol Biochem Parasitol*. 86:211-224.
71. Nussenzweig V, Goble FC. 1966. Further studies on the antigenic constitution of strains of *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi*. *Exp Parasitol* 18:224-230.
72. Nussenzweig V, Kloetzel J, Deane LM. 1963. Acquired immunity in mice infected with strains of immunological types A and B of *Trypanosoma cruzi*. *Exp Parasitol* 14:233-239.
73. Pérez BC, Padilla AM, Diosque P, Basombrío MA. 2006. *Trypanosoma cruzi*: infectivity modulation of a clone after passages through different hosts. *Exp Parasitol* 114:89-93.
74. Plessman CE. 1964. Growth and differentiation in *Trypanosoma cruzi*. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 6:93-100.
75. Porcel BM, Tran AN, Tammi M, Nyarady Z, Rydaker M, Urmenyi TP, Rondinelli E, Pettersson U, Andersson B, Aslund L. 2000. Gene survey of the pathogenic protozoan *Trypanosoma cruzi*. *Genome Res*. 8:1103-1107.
76. Postan M, Bailey JJ, Dvorak JA, McDaniel JP, Pottala EW. 1987. Studies of *Trypanosoma cruzi* clones in inbred mice. III. Histopathology and electrocardiographical responses to chronic infection. *Am J Trop Med Hyg* 37:541-9.

77. Postan M, Dvorak JA, McDaniel JP. 1983. Studies of *Trypanosoma cruzi* clones in inbred mice. *Am J Trop Med Hyg* 32:497-506.
78. Prata A. 2001. Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease. *Lancet Infect Dis* 1:92-100.
79. Prioli, RP; Mejía JS; Pereira MEA. 1991. On the interaction of *Trypanosoma cruzi* Neuraminidase and lipoproteins. *Eur J Epidemiol* 7:344-348.
80. Rassi A. 1979. Clínica: Fase aguda. In: *Trypanosoma cruzi* e Doença de Chagas. Editora: Guanabara Koogan. Rio de Janeiro, Brasil. Pp. 249-264.
81. Rodríguez E, Marinkelle CJ. 1970. *Trypanosoma cruzi*: Development in tissue culture. *Exp Parasitol* 27:78-87.
82. Romanha AJ. 1982. Heterogeneidade enzimática em *Trypanosoma cruzi*. Ph D Thesis. UFMG. Belo. 110 pp.
83. Sahagún Fray B. 1946. Historia general de las cosas de la Nueva España, vols I-IV. Ed. Porrúa. México.
84. Salazar-Schettino PM, Jiménez MJ, Tay J, Cárdenas RL. 1978. Estudio comparativo de la patogenicidad de cuatro cepas de *T. cruzi* en el ratón blanco. *Rev Lat-amer Microbiol* 20:51-57.
85. Schmidt GD, Roberts LS. 2000. Kinetoplasta: trypanosomes and their kin. In *Foundations of parasitology*, 6th ed. Mc Graw-Hill Higher Education Companies, Inc. USA., p. 55-81.
86. Schofield CJ. 1994 Biología y control Triatominae ed ZENECA UK.pp.154.
87. Schofield CJ, Diotaiuti L, Dujardin JP. 1999. The processo of domestication in triatominae. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 94:375-378.
88. Sherlock IA. 1979. Vectores. In: *Trypanosoma cruzi* e Doença de Chagas. Editora: Guanabara Koogan. Rio de Janeiro, Brasil. Pp. 42-88.

89. Soto RP, Fernandes O, Macedo AM, Campbell DA, Zingales B. 1996. DNA markers define two major phylogenetic lineages of *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol*. 83:141-152.
90. Souza MA. 1999. Morphobiological characterization of *Trypanosoma cruzi* Chagas, 1909 and its distinction from other trypanosomes. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1: 205-210.
91. Steindel M, Dias Neto E, Menezes CLP, Romanha AJ, Simpson AJG. 1993. Random amplified polymorphic DNA analysis of *Trypanosoma cruzi* strains. *Mol Biochem Parasitol* 60:71-80.
92. Tay J, Salazar SPM, Ontiveros D. 1969. El comportamiento en el ratón blanco de una cepa de *Trypanosoma cruzi* mediante pases sucesivos en diferentes especies de triatomas. *Rev Lat-amer Microbiol* 11:79-89.
93. Tay J, Gutiérrez QM, Salazar SPM, Castillo M, Ortega M. 1973. Estudios sobre seis cepas mexicanas de *Trypanosoma cruzi*. *Rev Inv Salud Pub* 33:67-76.
94. Tay J, Alonso T, Salazar SPM, De Haro I. 1980. Evolución de *Trypanosoma cruzi* cepa mexicana en el huésped vertebrado, invertebrado e *in vitro*. *Salud Pub Mex* XXII:513-520.
95. Thompson RCA, Lymberry AJ. 1990. Intraspecific variation in parasites – What is a strain? *Parasitol Today* 6:346-348.
96. Tibayrenc M, Ayala FJ. 1988. Isoenzyme variability in *Trypanosoma cruzi*, the agent of Chagas' disease: Genetic, taxonomical and epidemiological significance. *Evolution* 42:277-292.
97. Tibayrenc M, Brenier, SF. 1988. *Trypanosoma cruzi*: Major clones rather than principal zymodemes. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 83 suppl. 1:249-255.
98. Tibayrenc M. 1995. Population genetics of parasitic protozoa and other microorganisms. *Adv Parasitol* 36:47-115.

99. Tibayrenc M, Neubauer K, Barnabé C, Guerrini F, Skarecky D, Ayala F. 1993. Genetic characterization of six parasitic protozoa: parity between random primer DNA typing and multilocus enzyme electrophoresis. *Proc Natl Acad Sci USA* 90:1335-1339.
100. Toledo MJ, De Lana M, Carneiro CM, Bahia MT, Machado-Cohelo GL, Veloso VM, Barnabe C, Tibayrenc M, Tafuri WL. 2002. Impact of *Trypanosoma cruzi* clonal evolution on its biological properties in mice. *Exp Parasitol* 100:161-172.
101. Toma HK, Cerávolo IP, Guerra HL, Steindel M, Romanha AJ. 2000. *Trypanosoma cruzi*: parasitaemia produced in mice does not seem to be related to in vitro parasite – interaction. *Int J Parasitol* 30:593-597.
102. Velasco CO, Valdespino JL, Tapia-Conyer R, Salvatierra B, Guzmán-Bracho C, Magos C, et al. 1992. Seroepidemiología de la enfermedad de Chagas en México. *Sal Pub Mex* 34:186-196.
103. Velasco O, Guzmán BC, Rodríguez JC, López OO, González DF. 1991. La enfermedad de Chagas. Una revision histórica suscinta y parcial de lo que ocurre en México y en el mundo. Pub. Técnica INDRE. 56 pp. 156.
104. Vidal-Acosta V, Ibáñez-Bernal S, Martínez-Campos C. 2000. Infección natural de chinches Triatominae con *Trypanosoma cruzi* asociadas a la vivienda humana en México. *Sal Pub Méx* 42:496-503.
105. Villalta F, Kierszembbaum F. 1987. Insect-borne and culture derived metacyclic *Trypanosoma cruzi*: differences in infectivity and virulence. *Am J Trop Med Hyg* 36:529-532.
106. Watkins R. 1966. Comparison of infections produced by two strains of *Trypanosoma cruzi* in mice. *J Parasitol* 52:958-961.
107. Wittner M, Squillante L, Nadler JP, Tanowitz HB. 1982. *Trypanosoma cruzi*: colony formation and clonal growth in agar. *Exp Parasitol* 53:255-261.

108. World Health Organization Expert Committee. 2002. Control of Chagas' disease. In: WHO Technical Reports Series. Geneva, Switzerland. 905: 1-109.
109. World Health Organization. 1991. Control of Chagas disease. WHO Technical Reports Series. 811.95 pp.
110. Zárate GL, Zárate RJ. 1985. A checklist of the triatominae (Hemiptera: Reduviidae) of Mexico. *Int J Entomol* 27:102-127.
111. Zavala-Castro JE, Velasco-Castrejón O, Hernández R. 1992. Molecular characterization of mexican stocks of *Trypanosoma cruzi* using total DNA. *Am J Trop Med Hyg* 47:201-209.
112. Zhang, Q., Tibayrenc, M., Ayala, F.J. 1988. Linkage disequilibrium in natural populations of *Trypanosoma cruzi*, the agent of Chagas' disease. *J Protozool* 35: 81-85.
113. Zingales B, Colli W. 1985. *Trypanosoma cruzi*: Interaction with Host cells. *Current Top Microbiol Immunol* 117: 129-152.