



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE QUÍMICA

Caracterización biológica y bioquímica de cuatro aislados de
Trypanosoma cruzi

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

PRESENTA

MARTHA ISELA MENDOZA RODRÍGUEZ



MÉXICO, D.F.

2015



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: **Profesor: Abel Gutiérrez Ramos**

VOCAL: **Profesor: Luz del Carmen Castellanos Román**

SECRETARIO: **Profesor: Martha Irene Bucio Torres**

1er. SUPLENTE: **Profesor: Euclides Ávila Chávez**

2° SUPLENTE: **Profesor: José Cordero Hernández**

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

LABORATORIO DE BIOLOGÍA DE PARÁSITOS, FACULTAD DE MEDICINA, UNAM.

ASESOR DEL TEMA:

M. en C. Martha Irene Bucio Torres

SUPERVISOR TÉCNICO:

M. en C. Yolanda GUEVARA GÓMEZ

SUSTENTANTE:

Martha Isela Mendoza Rodríguez

Este trabajo fue realizado con el apoyo financiero de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico bajo el Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica en el proyecto “Validación de métodos para la confirmación del diagnóstico de la infección de *Trypanosoma cruzi* mediante el uso de marcadores biológicos específicos” con la clave IT200913

Abreviaturas

L.I.T. – Liver Infusion Triptose (medio de cultivo)

M. pallidipennis – *Meccus pallidipennis* (triatomino)

Morelos – Aislado obtenido de *Meccus pallidipennis* proveniente del Estado de Morelos

Mor/Tb – Aislado obtenido del cruce del aislado Morelos con *Triatoma barberi*

Querétaro - Aislado obtenido de *Triatoma barberi* proveniente del Estado de Querétaro

Qro/Mp - Aislado obtenido del cruce del aislado Querétaro con *Meccus pallidipennis*

RIPA - Radio-Immunoprecipitation Assay (amortiguador de lisis celular)

SDS-PAGE - sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico)

T. barberi - *Triatoma barberi* (triatomino)

ÍNDICE

1. RESUMEN.....	1
2. INTRODUCCIÓN.....	2
3. ANTECEDENTES.....	4
3.1 Enfermedad de Chagas.....	4
3.2 <i>Trypanosoma cruzi</i>	6
3.2.1 Ciclo biológico	8
3.3 Vectores	10
3.4 Mecanismos de transmisión	13
3.5 Patogenia	15
3.6 Cuadro clínico	16
3.7 Diagnóstico y tratamiento	19
3.8 Membrana del parásito y composición bioquímica	22
3.9 Interacción parásito-triatomino	23
3.10 Caracterización de aislados.....	24
JUSTIFICACIÓN	29
HIPÓTESIS.....	30
OBJETIVOS.....	30
4. METODOLOGÍA.....	31
4.1 Diseño experimental.....	31
4.2 Aislados de <i>Trypanosoma cruzi</i>	32
4.3 Determinación de curvas de crecimiento	32
4.4 Determinación de curvas de parasitemia.....	32
4.5 Extracción proteica	33

4.6 Cuantificación de proteínas	34
4.7 Separación de componentes proteicos y determinación de pesos moleculares por electroforesis en poliacrilamida (SDS-PAGE).....	34
4.8 Análisis de resultados.....	35
5. RESULTADOS.....	36
5.1 Curvas de crecimiento	36
5.2 Curvas de parasitemia	38
5.3 Curvas de sobrevivencia	40
5.4 Cuantificación de proteínas	42
5.5 Separación de componentes proteicos y determinación de pesos moleculares por electroforesis en poliacrilamida (SDS-PAGE).....	43
6. DISCUSIÓN	46
7. CONCLUSIONES	49
8. PERSPECTIVAS	50
9. BIBLIOGRAFÍA.....	51

1. RESUMEN

La caracterización biológica y bioquímica de los diferentes aislados de *Trypanosoma cruzi* es necesaria para comprender la variabilidad en la relación parásito-hospedero; la identificación de componentes con relevancia, puede además ser útil en el serodiagnóstico de la enfermedad. El comportamiento de los aislados depende de muchos factores: del transmisor, la especie del triatmino, la región geográfica, así como la altitud donde se localiza el insecto; en el caso del hospedero la susceptibilidad y resistencia. Se realizó el estudio de cuatro aislados: Morelos, Mor/Tb, Querétaro y Qro/Mp; dos de *Meccus pallidipennis* y *Triatoma barberi* provenientes de Morelos y Querétaro, y dos aislados producto de la infección experimental cruzada entre las dos especies de triatominos. Se determinó el comportamiento biológico y el perfil electroforético de proteínas. En el crecimiento en medio LIT, se presentó diferencia significativa entre Querétaro, con menor crecimiento parasitario, respecto a Qro/Mp y los cuatro aislados mostraron la mayor cantidad de parásitos entre los días 7 a 9. En el modelo murino los aislados Querétaro y Qro/Mp fueron más virulentos que los aislados Morelos y Mor/Tb, al mostrar diferencias en el periodo prepatente, la parasitemia y el tiempo en el que se presentó la mortalidad. En la determinación del perfil proteico se obtuvo una mayor concentración proteica con el método de extracción utilizando el amortiguador RIPA. En el SDS-PAGE, se identificaron componentes proteicos con pesos moleculares entre 103 y 14 kDa, de los cuales los de 72, 50, 38, 32 y 14 kDa, fueron compartidos con ambos métodos de extracción en los cuatro aislados; no fueron compartidos 4 componentes proteicos con peso molecular de 103, 96, 87 y 28 kDa. Se confirman diferencias en el comportamiento biológico y del patrón electroforético de proteínas.

2. INTRODUCCIÓN

La enfermedad de Chagas es una enfermedad causada por el parásito flagelado *Trypanosoma cruzi*, transmitido por hemípteros hematófagos de la familia *Reduviidae*. Esta enfermedad es endémica en Latinoamérica, se estima que a nivel mundial existen aproximadamente 10 millones de personas infectadas y más de 25 millones están en riesgo de adquirir la infección (OMS, 2013).

Trypanosoma cruzi es un parásito que pertenece al orden Kinetoplastida y a la familia Trypanosomatidae, presenta diferentes fases en su desarrollo; epimastigote, tripomastigote (metacíclico y sanguíneo) y amastigote. El parásito infecta 150 especies de animales domésticos y silvestres (Levine *et al.*, 1980; OMS, 2009). *Trypanosoma cruzi* presenta pleomorfismo natural a la que se le ha atribuido la diferencia de severidad con que se presenta la enfermedad en el humano y otros mamíferos. Considerando este aspecto los trabajos sobre caracterización de aislados son múltiples, los cuales abarcan aspectos biológicos, bioquímicos y moleculares. Se han realizado aislamientos del parásito de diversos hospederos, demostrándose una gran variación en la capacidad de infectar a células y la susceptibilidad ante agentes quimioterapéuticos.

En México, se han reportado 32 especies de vectores de *T. cruzi*. Dos de las especies transmisoras de importancia para el humano en el país, son *Meccus pallidipennis* y *Triatoma barberi*; el primero se encuentra distribuido en 13 estados, es una especie con predominio en el peridomicilio y se ha descrito como “vector visitante”, ya que entra en las viviendas para alimentarse. *Triatoma barberi* se encuentra distribuida en 12 estados y habita principalmente dentro del domicilio; los aislados de *T. cruzi* obtenidos de este vector son altamente virulentos, esto demostrado por la patología en modelo murino y en humanos (Salazar *et al.*, 2010).

La modulación de la virulencia y la infectividad de *T. cruzi* asociada con los vectores ha sido ampliamente documentada, dado que el parásito utiliza el lumen intestinal del insecto como ambiente de multiplicación y diferenciación, las interacciones que pueda

establecer el parásito con su entorno puede condicionar la variación de sus propiedades biológicas entre las cuales está la virulencia y la patogenicidad. En 1936, Mazzotti encontró que las cepas de *Trypanosoma cruzi* aisladas de *Triatoma barberi* eran más virulentas que las cepas de otras especies de triatomíneos del país. Tay *et al.*, en 1969, realizó estudios para explicar esta modificación en la virulencia, sin embargo, no se concluyó si ésta era dada por el vector o el hospedero.

Algunos aislados, en los que se han definido sus características histotrópicas, están siendo considerados como prototipos de clasificación. Para este fin, se han utilizado grados variables de virulencia, evaluada sobre los periodos prepatentes (inicio de la infección y presencia de signos), curso de la parasitemia e índices de mortalidad en modelos animales. Estos datos permiten comprender la relación hospedero-parásito, en la infección y el desarrollo de la enfermedad. La variabilidad en su comportamiento biológico y la heterogeneidad que presenta el parásito en un aislado, obliga a caracterizarlo. La caracterización biológica se basa en las diferencias existentes en el desarrollo del parásito en medios de cultivo y en mamíferos. El modelo de infección experimental en ratones ha sido uno de los más utilizados en la infección de *T. cruzi*, debido al fácil manejo de estos animales. En la caracterización bioquímica de *T. cruzi* han sido consideradas diferentes metodologías como la concentración de proteínas, el perfil proteico mediante electroforesis, perfil isoenzimático (electroforesis de enzimas), perfil de esquizodemos (ADN mitocondrial, polimorfismo de longitud del fragmento de restricción) y DNA polimórfico amplificado al azar, con el propósito de identificar componentes proteicos involucrados en la relación parásito/hospedero, grupo y / o linaje de *Trypanosoma cruzi*, entre otros. En México, son escasos los estudios al respecto, un estudio de análisis isoenzimático muestra que los aislados pertenecen al zimodemo 1 y de acuerdo al Simposio Internacional (1999), estos aislados podrían considerarse como miembros del grupo *T. cruzi* I (Tibayrene & Ayala, 1988; Hernández *et al.*, 2001; Devera *et al.*, 2003; Zingales *et al.*, 2009; Cura & Schijman, 2013).

3. ANTECEDENTES

3.1 Enfermedad de Chagas

La tripanosomiasis americana o enfermedad de Chagas, es una zoonosis compleja cuyo agente causal es el parásito *T. cruzi*, esta enfermedad se presenta en la mayor parte del continente americano y es un problema de salud pública especialmente en Latinoamérica. El parásito infecta a 150 especies de animales domésticos y silvestres (Rassi *et al.*, 2012). La existencia de la enfermedad de Chagas en humanos se asume que es debida a que el hombre fue entrando en contacto con los focos naturales y provocó desequilibrios ecológicos, forzó a los triatominos infectados o no, a ocupar viviendas humanas, se llevó a cabo el proceso de domiciliación y, así, encontraron refugio y suficiente alimento en la sangre humana y la de los animales domésticos; de esta forma el hombre entra a formar parte activa de la cadena epidemiológica de la infección por *T. cruzi*.

Debido a la migración humana de América Latina a diferentes lugares del mundo como son Estados Unidos, Canadá, Francia, España, Suiza, Australia y Asia (en especial Japón), Figura 1, se han presentado casos de tripanosomiasis americana, donde el vector no es endémico, así se ha visto que la transmisión en estos países desde 1980 es debido a donaciones de sangre, trasplante de órganos y transplacentaria (Carabarin Lima *et al.*, 2011; Schmunis, 2007).

La Organización Mundial de la Salud considera a la Enfermedad de Chagas como un problema de salud internacional, por lo que recomienda reforzar los programas de prevención, control y vigilancia; ya que esta enfermedad afecta a cualquier población, edad, raza y género (WHO, 2002). Según este organismo, se calcula que a nivel mundial existen alrededor de 10 millones de personas infectadas, más de 25 millones de personas están en riesgo de adquirir la infección. En 2008 esta enfermedad causó la muerte a 11 000 personas. La Organización Panamericana de la Salud (OPS), refiere que a partir de 2005, la enfermedad de Chagas se incorpora dentro de las enfermedades tropicales desatendidas y que en México, existen aproximadamente

1100 000 individuos infectados con 29 500 000 en riesgo de contraer la infección (OMS/A62/17/2009; OMS, 2013).

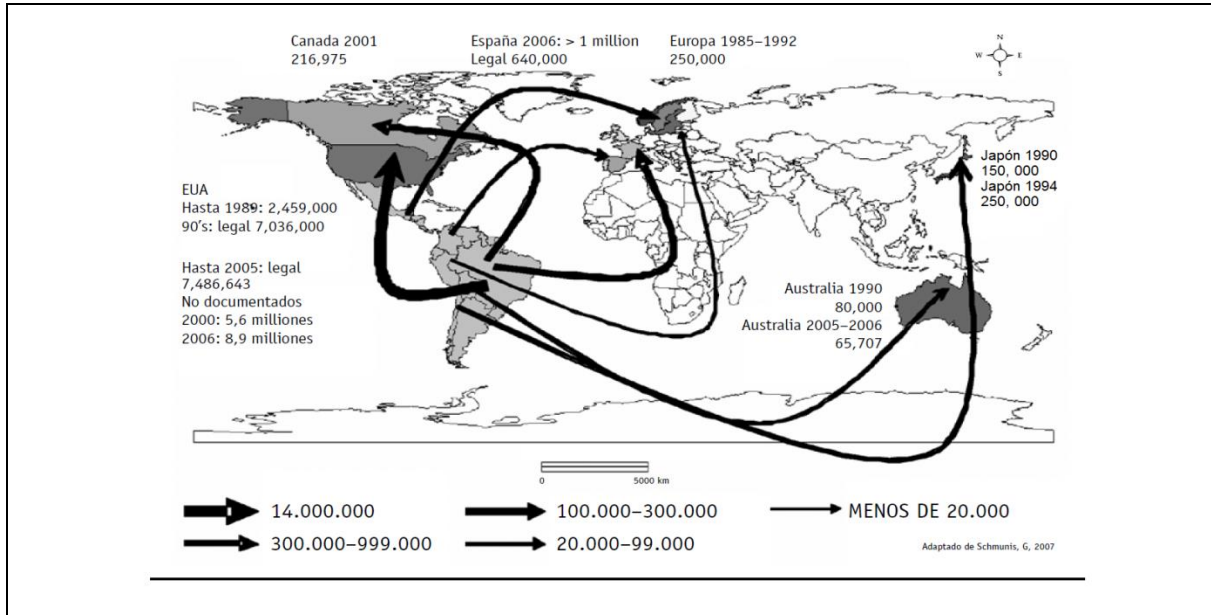


Figura 1. Distribución mundial de la enfermedad de Chagas. Impacto de la inmigración de gente infectada de América Latina a países no endémicos de la enfermedad (Schmunis, 2007).

En México en el período de 2000 al 2012 se han registrado 5559 casos de enfermedad de Chagas (esta cifra incluye casos agudos y crónicos). Los grupos de edad más afectados se encuentran dentro de la edad productiva principalmente entre los 25 y 44 años. Los estados con mayor número de casos reportados son Veracruz, Morelos, Oaxaca, Yucatán, Chiapas y Guerrero (SINAVE); con 248 casos agudos. Los estados con mayor número de casos crónicos son: Morelos con 132 (53.2%), Veracruz 44 (17.7%) y Jalisco 15 (6.0%); los casos crónicos con formas sintomáticas fueron 192, los cuales presentaron cardiopatía chagásica. Las defunciones registradas fueron 371, las cuales ocurrieron con mayor número en Oaxaca y Guerrero (70.1%) y el 29.9% en otras dieciocho entidades (Secretaría de Salud: CENAPRECE, SINAVE, SINAI SUIVE, 2014).

3.2 *Trypanosoma cruzi*

TAXONOMIA

Reino Protista
Subreino Protozoa
Phylum Sarcomastigophora
Subphylum Mastigophora
Clase Zoomastigophorea
Orden Kinetoplastida
Suborden Trypanosomatina
Familia Trypanosomatidae
Género *Trypanosoma*
Especie *Trypanosoma cruzi*

MORFOLOGÍA

T. cruzi es un protozoo hemoflagelado, que se caracteriza por la presencia del cinetoplasto, formado por una red fibrosa de ADN extranuclear localizada en la mitocondria, posee un ciclo de vida complejo, presenta tres fases morfológicas en dos hospederos: el vector (hospedero invertebrado) y el hospedero mamífero. La definición de estas fases se basa en la forma y la posición del cinetoplasto (región donde emerge el flagelo) con relación al núcleo, Figura 2. (De Souza, 1984).

El **amastigote** es una forma redonda u ovalada, mide de 2-5 μm de diámetro, su flagelo se encuentra en una bolsa visible, presenta un núcleo y un cinetoplasto grandes, es la forma intracelular se multiplica por división binaria, en el hospedero mamífero, con capacidad de infectar otras células (Chagas, 1909; Tay *et al.*, 1980; Garcia *et al.*, 2010).

El **epimastigote**, forma de aspecto fusiforme, replicativa, no infectiva para los mamíferos, mide de 20 a 40 μm de longitud, con el cinetoplasto en la posición anterior y cerca del núcleo, y el flagelo recorre a lo largo del cuerpo y se observa una membrana ondulante corta, se multiplica en el intestino de los triatominos y se diferencia en

tripomastigotes metacíclicos, también se encuentra en el medio de cultivo axénico (Chagas, 1909; Tay *et al.*, 1980; Garcia *et al.*, 2010).

El **tripomastigote** mide aproximadamente 20-25 μ m de longitud y tiene un diámetro de 2 μ m, tiene el cinetoplasto y el bolsillo flagelar en el extremo posterior del cuerpo. El flagelo se extiende a la parte anterior a lo largo de una membrana ondulante, se observa en las células de tejidos y en la sangre del hospedero, en el intestino posterior, en heces y orina del hospedero invertebrado, fase estacionaria de cultivos axénicos y en la fase líquida de cultivos celulares. Esta forma no se divide. El **tripomastigote metacíclico** es la forma infectante, producto de la diferenciación de los epimastigotes en el intestino medio posterior del vector. El **tripomastigote sanguíneo** es producto de la diferenciación del amastigote, presentan formas de “S” y “C” en los frotis, tiene la capacidad de invadir otras células (Chagas, 1909; Tay *et al.*, 1980; Garcia *et al.*, 2010).

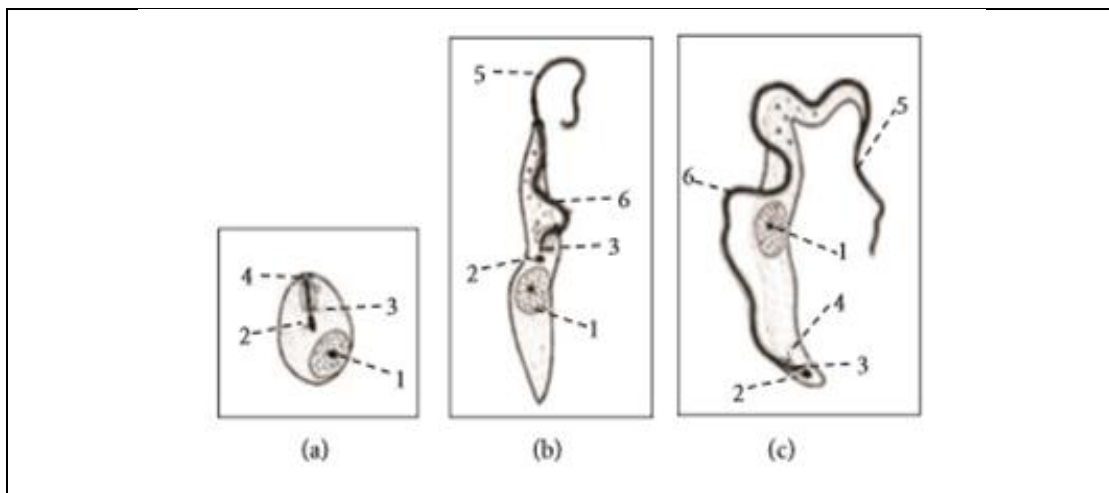


Figura 2. Estadios morfológicos de *Trypanosoma cruzi*. a) Amastigote, b) Epimastigote, c) Tripomastigote. 1) Núcleo, 2) Cinetoplasto, 3) Cuerpo basal, 4) Bolsa flagelar, 5) Flagelo y 6) Membrana ondulate (Ferreira *et al.*, 2012).

3.2.1 Ciclo biológico

El ciclo de vida de *T. cruzi* es complejo, se observan varias formas de desarrollo en los insectos vectores y los mamíferos (Figura 3). Los insectos se infectan al alimentarse de la sangre de animales o seres humanos que tienen parásitos circulantes (tripomastigotes sanguíneo). En el tracto digestivo de los triatomíneos, los tripomastigotes se diferencian en epimastigotes y luego a tripomastigotes metacíclicos en la parte final del intestino. La infección de los mamíferos se produce cuando entran en contacto con las formas metacíclicas infectivas del parásito que se eliminan con las heces de triatomíneos después de la alimentación. Este contacto se produce a través de la mucosa o por lesión, ya sea preexistente o como resultado de la picadura del insecto.

Una vez en el huésped vertebrado, los tripomastigotes metacíclicos invaden las células del tejido cercano al sitio de entrada, y se diferencian en amastigotes y se dividen por fisión binaria. Cuando la célula está invadida con amastigotes, se transforman de nuevo en tripomastigotes. Los tripomastigotes provocan la lisis de las células, invaden los tejidos adyacentes, y se extienden a través de los vasos linfáticos y el torrente sanguíneo, principalmente a células musculares (cardíacas, liso y esquelético) y ganglionares. El ciclo de transmisión se completa cuando los tripomastigotes circulantes en la sangre son ingeridos por otros vectores (Rassi *et al.*, 2012).

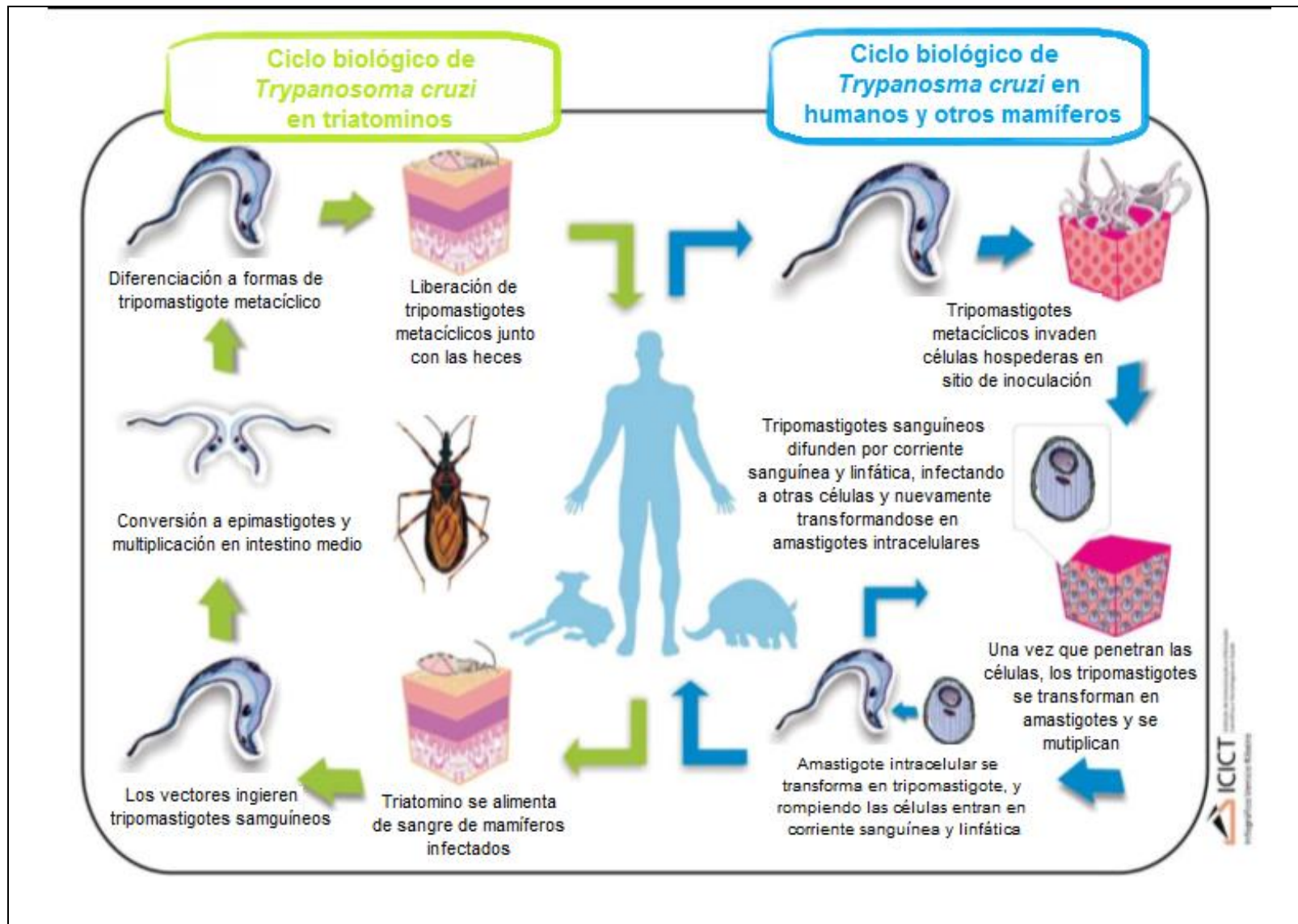


Figura 3. Ciclo biológico de *Trypanosoma cruzi*, en mamíferos y vectores. Venício Ribeiro, ICICT/Fiocruz. (Argolo *et al.*, 2008).

3.3 Vectores

TAXONOMÍA

Reino *Animalia*

Phylum *Artropoda*

Subphylum *Mandibulata*

Clase *Insecta (Hexapoda)*

Orden *Hemiptera*

Familia *Reduviidae*

Subfamilia *Triatominae*

Géneros *Belminus*

Dipetalogaster

Eratyrus

Panstrongylus

Paratriatoma

Rhodnius

Triatoma

Meccus

Características generales





Los triatominos son los únicos vectores naturales de *T. cruzi*, son artrópodos hematófagos, presenta un desarrollo de huevo a adulto, pasando por 5 estadios ninfales (Jurberg & Galvao, 2006). Aproximadamente 140 especies de triatominos son potencialmente transmisores de la infección y la mayoría están en América Latina (García *et al.*, 2010), las especies de mayor importancia son las que se encuentran en las viviendas, al estar construidas éstas con material considerado de riesgo para la colonización de estos insectos, en el que predomina el barro, la paja, las ramas, las

hojas de palma y otros elementos favorecedores de la formación de grietas y hendiduras en las casas rurales, donde se ocultan, los triatominos en general tiene actividad nocturna. También se pueden encontrar en zonas peridomiciliares como gallineros o corrales. Se conocen con más de 40 nombres comunes; entre otros, chinches o chinches besuconas.

En México, se han reportado 32 especies de triatominos, de las cuales 13 son de importancia epidemiológica, por su localización geográfica, doméstica e infección natural con *T. cruzi*. En el país no sólo se localizan los transmisores en zonas tropicales y subtropicales, sino también a alturas mayores a 1800 metros sobre el nivel del mar, los vectores con mayor índice de infección asociados a serologías altas se encuentran sobre todo en la parte centro y sur del país; como es el caso de *Triatoma barberi*, Tabla 1, que es considerada como una de los transmisores más importantes, de predominio intradomiciliario, su tiempo de defecación es rápido ocurriendo durante la alimentación, presentando un alto porcentaje de ejemplares positivos a la infección de *T. cruzi* en estudios realizados en diferentes estados de la República y además sus aislados presentan una alta patogenicidad (Salazar *et al.*, 2010).

Meccus pallidipennis se encuentra con predominio en el peridomicilio, se ha capturado a plena luz del día, tiene un patrón de defecación prolongado, se ha observado que la infección de estos triatominos a *T. cruzi* es muy baja (Salazar *et al.*, 2010).

Tabla 1. Variables biológicas de dos especies de triatomos (Salazar *et al.*, 2005, 2010)

Triatomo	<i>Triatoma barberi</i>	<i>Meccus pallidipennis</i>
Características	<p>Hembras: 18.5-20mm Machos: 16-18mm Altura: 2000msnm</p> 	<p>Hembras: 32-35mm Machos: 31-34mm Altura: 200-1850msnm</p> 
	<p>Vector con predominio en el intradomicilio. Defecación durante la alimentación Aislados de mayor virulencia Atracción con luz artificial</p>	<p>Vector con predominio en el peridomicilio Defecación a 20-30 min posterior a la alimentación Aislados con menor virulencia No se altera por la presencia de luz.</p>
Distribución geográfica	 <p>Distribuido en 12 estados de la república.</p>	 <p>Distribuido en 13 estados de la república.</p>

3.4 Mecanismos de transmisión (Figura 4)

Transmisión por vectores. La transmisión vectorial es la primera en frecuencia, es causada por las deyecciones de triatomíneos con *Trypanosoma cruzi* en la piel de mamíferos, en el momento de alimentarse (Toso *et al.*, 2011). La mayoría de los casos de enfermedad de Chagas se atribuyen a las especies de vectores domiciliados.

Transmisión por transfusión. La forma transfusional es la segunda en frecuencia, dada por los movimientos migratorios de zonas rurales a urbanas que se produjeron en América Latina cambiaron las características epidemiológicas tradicionales y la infección de ser primordialmente rural, pasó a ser urbana y transmisible por transfusión de sangre. En los últimos 20 años, el número de donantes con serología positiva ha sido elevado en los países endémicos. Actualmente, en América Latina se ha establecido la obligatoriedad de que los bancos de sangre dispongan de sistemas de análisis de los donantes para prevenir la transmisión por transfusión de sangre (Rassi *et al.*, 2012).

Transmisión congénita (connatal). La prevalencia de la infección en mujeres en edad fértil es muy variable en los diferentes países endémicos. La enfermedad congénita está presente en las zonas rurales, sin embargo se notifica con mayor frecuencia en ciudades en las que no hay transmisión vectorial, pero a las cuales han inmigrado mujeres infectadas en edad reproductiva. El riesgo parece variar según diferentes factores epidemiológicos, como la cepa del parásito, la parasitemia de la madre, la existencia de lesiones en la placenta y la región geográfica donde vive la madre. La transmisión congénita depende de la prevalencia de la infección en mujeres fértiles infectadas de manera vectorial.

Transmisión por trasplante de tejidos y órganos. Ha habido casos de receptores de órganos de donadores con enfermedad de Chagas crónica que han sufrido enfermedad aguda y en cuya sangre periférica se ha aislado el parásito. Los trasplantes renales son los más frecuentes en la enfermedad, los de corazón, médula ósea y páncreas de donantes vivos y muertos son también posibles causantes de transmisión del parásito.

Transmisión accidental. Se han notificado la transmisión accidental de la enfermedad de Chagas humana en laboratorios y hospitales de países endémicos y no endémicos. Se han registrado más de 70 casos documentados en técnicos, médicos e investigadores al manipular diferentes tipos de materiales contaminados, como excretas de triatominos, cultivos de parásitos y sangre infectada de seres humanos y animales (WHO, 2002).

Transmisión oral. En diversas epidemias que han tenido lugar en Brasil, Colombia y México se ha documentado la transmisión oral de la enfermedad de Chagas por la ingestión de alimentos contaminados con triatominos infectados o sus heces, como el jugo de caña, guayaba y acai, o por la ingestión de carne semi-cruda o cruda de animales infectados (reservorios) de manera cultural (Tosso *et al.*, 2011).

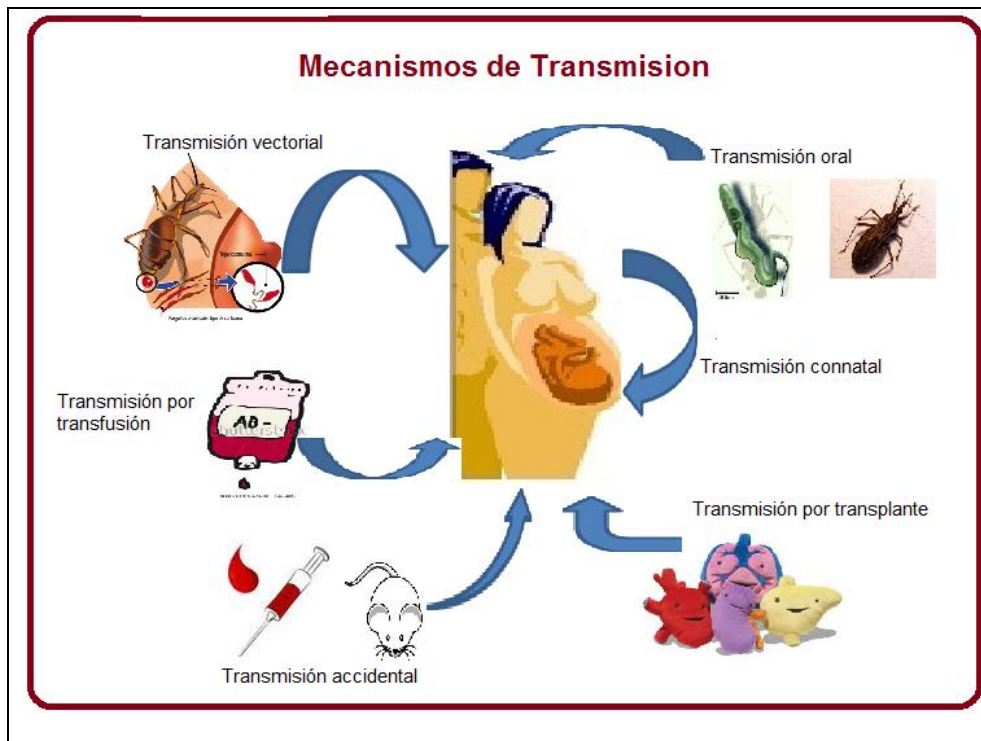


Figura 4. Mecanismos de transmisión de la infección por *T. cruzi*

3.5 Patogenia

El agente causal de la enfermedad, *Trypanosoma cruzi* produce lesiones por diferentes mecanismos los cuales están relacionados con factores que determinan la evolución de la infección y dependen del parásito y el huésped (Rassi *et al.*, 2012).

Inicialmente la infección se produce con la entrada de tripanosomas en leucocitos y células de tejido subcutáneo. Una vez que el parásito penetra las células que rodean el sitio de infección, y completa varios ciclos de replicación intracelular por división binaria, se disemina por sistema linfático, torrente sanguíneo y a diversas células del hospedero, concentrándose en músculo, células ganglionares, bazo, hígado y músculo cardíaco. Se puede establecer el primer contacto con los macrófagos y fagocitarse, evadiendo la respuesta inmune y replicarse en el citoplasma.

Las cepas más virulentas tienen mayor poder de penetración, sus amastigotes presentan mayor índice de mortalidad de las células, así mientras mayor sea el número de parásitos y células muertas, mayor será la cantidad presentada de antígenos parasitarios liberados. Este parásito puede invadir cualquier órgano, se ha demostrado que aunque hay cepas con tropismos bien definidos para células, tejidos u órganos, las células con mayor parasitismo son las musculares cardíacas, macrófagos, fibroblastos, sistema nervioso central y/o periférico y musculares estriadas o lisas.

Tabla 2. Principales factores relacionados con la patogenia

Parásito:	Polimorfismo Tropismo Virulencia Constitución antigénica Cantidad de parásitos	Hospedero:	Sexo Edad Especie Raza Infecciones Respuesta inmunológica Temperatura Estado nutricional y dieta
------------------	--	-------------------	---

3.6 Cuadro clínico

La enfermedad de Chagas presenta dos fases: la fase aguda y la fase crónica asintomática y sintomática, Tabla 3.

3.6.1 Fase aguda

Esta fase, inicia al momento de adquirir la infección dura entre 30 y 90 días, se caracteriza por una alta parasitemia y es detectable por métodos parasitológicos, generalmente es asintomática. En la transfusión sanguínea los síntomas se presentan entre los 20 y 40 días de la transfusión.

Menos del 5% presentan algunos signos y síntomas después de 8 a 10 días de la infección, conocidos como “puerta de entrada”, como el chagoma de inoculación, un proceso inflamatorio agudo localizado en el sitio de infección, produce una induración violácea, o edema unilateral bipalpebral con adenitis conocido como signo de Romaña (complejo oftalmo-ganglionar), se acompaña de malestar general, fiebre, dolor muscular o articular; estos signos suelen desaparecer después de 30 a 60 días (Rassi *et al.*, 2012; WHO, 2010)

3.6.2 Fase crónica

La fase crónica comienza cuando los niveles de parasitemia son muy bajos y desaparecen síntomas. Se han identificado la forma asintomática y la sintomática (WHO, 2002).

Asintomática (indeterminada)

La infección solo se detecta mediante pruebas serológicas, los métodos parasitológicos son de baja sensibilidad en esta fase. Aproximadamente el 70% de las personas infectadas permanecen en esta fase por el resto de su vida, se identifican mediante encuestas epidemiológicas o exámenes médicos y/o serológicos como en los donantes de sangre en zonas endémicas.

Se pueden presentar alteraciones electrocardiográficas aisladas (taquicardia y arritmias), se detectan accidentalmente cuando el paciente presenta otro padecimiento y al realizar pruebas serológicas para detectar la infección por *T. cruzi*, resultan

positivas, los individuos seropositivos se identifican mediante encuestas epidemiológicas, estudios de tamizaje en candidatos a donación, estudios electrocardiográficos y radiológicos del corazón esófago y colon.

Sintomática

Varios años después del inicio de la fase crónica, aproximadamente el 30% de las personas afectadas, desarrollan lesiones en diversos órganos, se han reportado alteraciones con aumento de tamaño (megas) principalmente en corazón, esófago y colon, así como en otras vísceras huecas.

Forma cardiaca


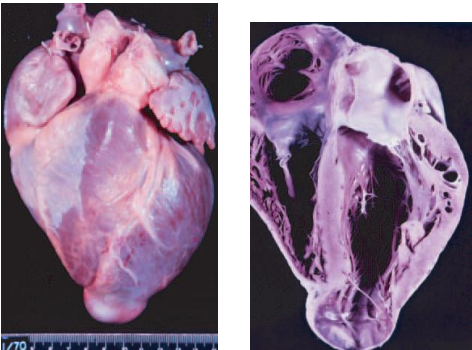


La miocardiopatía chagásica es la consecuencia clínica más importante de la infección, las manifestaciones clínicas van desde síntomas leves hasta la insuficiencia cardiaca y muerte súbita. No se conocen los factores que causan la transición de la forma indeterminada a la cardiaca. Las principales manifestaciones de la miocardiopatía chagásica crónica son la insuficiencia cardiaca, arritmias cardiacas y trastornos tromboembólicos (Rassi *et al.*, 2012; WHO, 2002).

Forma digestiva

Lesiones en sistema nervioso entérico producen los llamados megas en diferentes órganos, siendo los más frecuentes el esófago y el colon. Se han descrito megas en estómago, duodeno, vesícula biliar e incluso en vejiga y útero.

La forma digestiva se presenta rara vez en México, aunque es común en Brasil, Argentina, Chile y Bolivia, debido a la diferencia en las cepas del parásito. La disfunción gastrointestinal (megacolon, megaesófago o ambos) se presentan cerca del 10 al 15% de pacientes en fase crónica (Rassi *et al.*, 2012).

Tabla 3. Signos de la Enfermedad de Chagas en las fases aguda y crónica

FASE AGUDA	FASE CRÓNICA	
 <p data-bbox="185 940 540 1062">Signo de Romaña. Característico de la fase aguda. (Cortesía Dra. Paz María Salazar Schettino)</p>	 <p data-bbox="586 940 1040 993">Corazón chagásico. Característico de la fase crónica de la enfermedad</p>	 <p data-bbox="1216 695 1344 722">Megacolon</p>  <p data-bbox="1317 905 1471 932">Megaesófago</p>

3.7 Diagnóstico y tratamiento

Para el diagnóstico de la enfermedad, han sido utilizados diferentes métodos parasitológicos e inmunológicos; los cuales a través del tiempo han mostrado una sensibilidad, especificidad y reproducibilidad aceptables. La presencia del parásito y los anticuerpos anti-*Trypanosoma cruzi* que constituyen los elementos más relevantes para el diagnóstico.

Parasitológico:

En la fase aguda los parásitos están presentes en la sangre periférica y son detectados en pruebas directas como el examen directo, gota gruesa y frote sanguíneo. En la observación microscópica de la sangre fresca se puede observar la presencia del parásito por su motilidad. Las extensiones de sangre en gota fina y gruesa, teñidas adecuadamente permiten observar características morfológicas del parásito. El método de Strout y el microhematocrito son métodos directos por concentración. Las técnicas parasitológicas de expansión o amplificación como: hemocultivo, inoculación al ratón y pruebas moleculares como la PCR tiene indicaciones precisas y se realizan en laboratorios especializados. La técnica de PCR es recomendada en el diagnóstico de infección congénita y en protocolos de investigación dirigidos al estudio de la eficacia terapéutica (DNDi, 2014).

Inmunodiagnóstico:

Estos métodos son generalizados debido a que, los individuos infectados generan anticuerpos contra los antígenos del parásito, principalmente IgG e IgM.

Pruebas serológicas convencionales

Las pruebas serológicas son útiles en la fase crónica asintomática (indeterminada) y sintomática de la enfermedad, con la finalidad de identificar anticuerpos específicos contra *Trypanosoma cruzi*. Los métodos serológicos recomendados por la OMS son ELISA, inmunofluorescencia indirecta (IFI) y hemaglutinación indirecta (HAI); para la confirmación del diagnóstico de infección por *T. cruzi* deben realizarse al menos dos pruebas serológicas de diferente principio (WHO, 2002; UNAM & OPS, 2006; BID, OPS, IDRC, & CNZ, 2010).

La discordancia entre dos de ellas con fines diagnósticos obliga a repetir las pruebas o utilizar la prueba de inmunoelectrotransferencia (Western blot).

Pruebas serológicas no convencionales

Se basan en la técnica de ELISA, pero utilizan proteínas recombinadas, antígenos purificados o péptidos sintéticos, creados para aumentar la especificidad del diagnóstico serológico y evitar la reactividad cruzada con otras enfermedades parasitarias, como Leishmaniasis cutánea y visceral. Se han propuesto métodos inmunocromatográficos como tiras rápidas. Las pruebas más usadas son las de antígenos recombinantes, la mayoría de las pruebas no convencionales poseen gran especificidad, pero su sensibilidad es inferior a las convencionales (WHO, 2002).

Tabla 4. Para el diagnóstico de laboratorio de la enfermedad de Chagas (WHO, 2002)

Objetivos	Métodos serológicos y moleculares				
	Convencionales			No convencionales	
	ELISA	IFI	HAI	Antígenos recombinados	RCP
Demostración serológica (se recomiendan 2 pruebas)	X	X	X	X	
Detección en bancos de sangre (se recomienda una prueba)	X				
Transmisión transplacentaria y perinatal (se recomiendan 2 pruebas)	X	X		X	X
Encuestas epidemiológicas (se recomienda una prueba)	X	X			
Seguimiento del tratamiento (se recomiendan dos pruebas)	X	X	X		X

Tratamiento

Actualmente para el tratamiento de la enfermedad se dispone de benznidazol y nifurtimox, aprobados por la OPS/OMS y los ministerios de salud de los países afectados; ambos con mayor eficacia si se administran durante la fase aguda; de igual forma es necesario el tratamiento oportuno de las afecciones cardíacas o digestivas. (Rassi *et al.*, 2012; OMS, 2013).

El tratamiento en fase aguda es útil para reducir la gravedad de los síntomas y acortar la duración de la parasitemia, en la fase crónica en niños y adolescentes se ha demostrado una alta tasa de curación a la infección. Los objetivos son curar la infección y prevenir lesiones en los órganos, el éxito de cura es de 70 a 95%. Existiendo una mejor respuesta en cuanto menor es la edad en que se inicia el tratamiento (Buenos Aires: Ministerio de Salud de la Nación, 2012).

3.8 Membrana del parásito y composición bioquímica

La membrana plasmática está compuesta por proteínas, lípidos y carbohidratos como glucocálix, que están fuera de la membrana. Los componentes de superficie de las membrana del parásito se encuentran anclados a la capa fosfolipídica de la membrana por medio de glicosilfosfatidilinositol (De Souza, 1984).

La membrana del parásito posee propiedades adicionales como la presencia de receptores para la unión y penetración de las células del hospedero vertebrado, la habilidad de sobrevivir en ambientes hostiles dentro del tracto gastrointestinal del insecto vector y la resistencia al sistema inmune del hospedero (Snary, 1985). La supervivencia del parásito dentro de estos ambientes requiere de una abundante cubierta de glicoproteínas y glicolípidos, transportadores de membrana menos abundantes, enzimas de superficie y receptores que son llevados a la superficie celular por medio de una invaginación especializada en la membrana plasmática, denominada bolsilla flagelar (McConville, 2002).

Las formas de los medios de cultivo contienen de 43 a 57% de proteína de su peso en seco. Las proteínas y aminoácidos son utilizados como forma de energía como el azúcar libre en el medio (Brener, 1973).

La membrana del epimastigote está constituida generalmente por 31% de proteínas, 34% de lípidos, 16% de carbohidratos y 9% de esteroides (Snary, 1985).

3.9 Interacción parásito-triatomino

Se ha observado que la virulencia de un aislado probablemente se relaciona con la especie del triatomino del que se aisló y el lugar de donde éste se localiza. Un factor que también se considera de forma importante es lo que sucede cuando una misma cepa, al pasarla por diferentes especies de transmisores cambia su comportamiento al evaluarla en ratón blanco, esto ocurre en la naturaleza, cuando una cepa pasa por transmisores de distintas especies (Tay *et al.*, 1969). Se ha visto que las cepas que se adaptan mejor al insecto vector y con una mejor capacidad de metaciclogénesis serán las que puedan infectar más eficientemente al reservorio mamífero (Monteón *et al.*, 2009). Se establece que las cepas de *T. cruzi* que se aíslan de diversas especies de triatominos y de regiones diferentes en un mismo país se comportan de manera diferente al infectar a animales de laboratorio como son niveles de parasitemia y tropismo hacia determinados tejidos y órganos. Por otro lado, mientras que en algunos países, la enfermedad presenta compromiso importante de órganos (corazón y aparato digestivo principalmente), que requiere de un manejo médico altamente especializado y que implica costos elevados; en otros países, las infecciones son leves y no producen algún daño (Tay *et al.*, 1969).

Otro aspecto importante, es la interacción entre el parásito y los componentes del intestino del insecto (enzimas y la microbiota intestinal), lo que puede darle cierta virulencia a las cepas que infectan a los humanos (García *et al.*, 2010). Otros estudios, indican que la fuente de alimentación del insecto influye en la virulencia del aislado (Calderón-Arguedas *et al.*, 2003).

3.10 Caracterización de aislados

Las poblaciones de *Trypanosoma cruzi* que circulan en el humano presentan variaciones en morfología, letalidad, virulencia e incluso en tasa de infectividad. Los aislados presentan un patrón biológico y comportamiento patológico diferente, por lo que es necesaria la caracterización de éstos en las diferentes zonas endémicas de la enfermedad, sobre todo estudios de sobrevivencia en modelo animal, que son muy útiles para determinar el curso de la infección (Suárez *et al*, 2009).

El comportamiento del parásito puede estar influenciado por el mismo hospedero o las condiciones del medio ambiente, lo que ha incrementado la tendencia a realizar una caracterización de las diferentes cepas de *T. cruzi*. Así mismo, uno de los problemas planteados consiste en saber si las diferencias que se observan en la presentación de los cuadros clínicos y en la respuesta de los pacientes al tratamiento, se debe a las diferencias biológicas entre las cepas de *T. cruzi* que prevalecen en cada área geográfica, o a las diferencias genéticas entre las poblaciones humanas susceptibles. Por otro lado, se han identificado por varios métodos la marcada heterogeneidad a nivel bioquímico y molecular de las diferentes cepas del parásito, así como la variabilidad en su comportamiento biológico para correlacionar con los hallazgos clínicos y epidemiológicos (Guzmán-Marín *et al.*, 1999).

Los estudios muestran que *T. cruzi* comprende una población muy heterogénea de organismos, tanto genética como fenotípica manifiestan esta heterogeneidad desde el punto de vista biológico (comportamiento en los vertebrados y triatomíneos); patológico (tropismo de tejido, la virulencia, la intensidad de las reacciones inflamatorias, formas clínicas indeterminadas y cardíacas y / o digestivas, y mortalidad); inmunológico y bioquímico (Monteiro *et al.*, 2012).

Los estudios de caracterización biológica permiten conocer el comportamiento de un aislado en un modelo animal, y así tratar de comprender el cuadro clínico que ocasiona en el hombre (Suarez *et al.*, 2009). A partir de 1950 se han caracterizado diferentes aislados, debido a que existen diferencias entre la evolución clínica y la severidad del cuadro clínico. En los países endémicos, esto ha permitido establecer que *T. cruzi* proviene de humanos, de diferentes transmisores, de reservorios y de regiones del mismo país, los cuales se comportan de forma diferente cuando se han infectado experimentalmente animales de laboratorio; estas diferencias se manifiestan en el número de parásitos en sangre, tropismo a diferentes tejidos y virulencia, lo que se manifestará en la evolución de la infección (infección-enfermedad-muerte). Las diferencias en el comportamiento se han atribuido a múltiples causas como son factores ambientales, inmunidad, virulencia y patogenicidad. Diversos estudios sugieren que la virulencia de *T. cruzi*, depende del número de tripomastigotes inoculados, sin embargo Mazzotti (1940) atribuye la virulencia a la susceptibilidad del hospedero al parásito; por otro lado Phillips (1960) la atribuye a la localización y multiplicación del parásito en los tejidos infectados.

En 1969, Tay *et al.*, demuestran que un aislado que se mantiene en el modelo murino mantiene su virulencia y su tropismo a tejidos, y que al modificar el modelo de infección (infectando especies de triatominos diferentes al original y posteriormente infectando ratones); la parasitemia disminuyó, el tropismo tisular del parásito se modificó y la atrofia de las extremidades traseras (síntomas de enfermedad en el modelo murino) se presentó tardíamente (2-3 días previo a la muerte).

Con el propósito de evaluar la virulencia en modelo murino de seis cepas mexicanas aisladas de diferentes triatominos y reservorios procedentes de diversas regiones de la República, se evaluó el número de parásitos en sangre y de nidos de amastigotes en cerebro, corazón, músculo, esófago, ganglios, bazo, hígado y páncreas; todos los aislados mostraron diferencias en la parasitemia e invasión a órganos. Determinaron que hay factores que influyen en la virulencia de las cepas como son la zona geográfica de origen, la temperatura, la humedad, la especie de triatolino transmisor y la susceptibilidad a la infección (Tay *et al.*, 1973).

En otros estudios de aislados de diferentes especies de triatomíneos y de humano provenientes de la misma zona geográfica se observan diferencias en el inicio de la parasitemia, número de parásitos en sangre, atrofia de cuartos traseros, mortalidad, tropismo tisular y número de nidos de amastigotes, concluyeron que la parasitemia y virulencia de las cepas es diferente aunque provengan de la misma especie de triatomo y región geográfica (Salazar *et al.*, 1975; Salazar *et al.*, 1978).

Aguilar, en 2004, caracterizó cuatro aislados provenientes de diferentes especies de triatomíneos (*T. barberi*, *T. dimidiata*, *M. pallidipennis* y *T. mexicana*) y estados de la República Mexicana, cada uno mostró comportamientos diferentes.

En un aislado de *T. infestans* proveniente de Perú, se determinó parasitemia y mortalidad; se observaron cambios en la apariencia de los ratones, parálisis de cuartos traseros, incontinencia urinaria y convulsiones; mediante observación macroscópica se encontró mayor tamaño, congestión y edema en corazón y encéfalo por lo que fue considerada como cepa neurotrópica (Díaz-Lima *et al.*, 2004).

Con relación a la sobrevivencia de ratones hembras y machos infectados con diferentes concentraciones de parásitos y formas parasitarias (tripomastigotes metacíclicos y tripomastigotes sanguíneos), se observó diferencia en el tiempo en que se identificaron los parásitos en sangre y se presentó la mortalidad al 100% , no hubo diferencias con respecto al sexo entre los grupos de estudio, los ratones infectados con tripomastigotes metacíclicos presentaron una mayor parasitemia en menor tiempo (Suarez *et al.*, 2009).

En la caracterización de 5 aislados mexicanos, tres procedentes de triatomíneos (*Triatoma longipennis*, *T. pallidipennis* y *T. picturata*) del estado de Jalisco y dos de casos humanos procedentes de Oaxaca y Guanajuato; se observaron diferencias en el día que se identificaron parásitos en sangre y la mortalidad de los ratones infectados, la mayor virulencia se presentó en los ratones infectados con el aislado de humano en fase crónica procedente de Guanajuato. La caracterización molecular de los aislados (amplificación aleatoria de DNA polimórfico) mostró que las cepas tienen variabilidad

intraespecie considerándolas genéticamente diferentes, demostraron predominio del genotipo TcI en estos aislados. (Gómez-Hernández *et al.*, 2011).

Monteiro *et al.*, en 2012, estudió el comportamiento biológico de diferentes aislados procedentes de mamíferos (humano, marsupiales y triatominos) de una zona no endémica del Amazonas; los aislados presentaron baja virulencia, la parasitemia fue muy baja y la mortalidad fue baja o nula; en el estudio histopatológico se observaron procesos inflamatorios en músculo esquelético y cardiaco, presentaron escasos nidos de amastigotes; los aislados fueron clasificados como TcI.

En la caracterización bioquímica de *T. cruzi* han sido consideradas diferentes metodologías como la concentración de proteínas, el perfil proteico mediante electroforesis, perfil isoenzimático (electroforesis de enzimas), perfil de esquizodemos (ADN mitocondrial, polimosfirmo de longitud del fragmento de restricción) y DNA polimórfico amplificado al azar, con el propósito de identificar grupo y / o linaje de *Trypanosoma cruzi* (Tibayrene & Ayala, 1988; Devera *et al.*, 2003; Zingales *et al.*, 2009). En México, son escasos los estudios al respecto; un estudio de análisis isoenzimático muestra que los aislados pertenecen al zimodemo 1, y estos aislados podrían considerarse como miembros del grupo *T. cruzi* I (Hernández *et al.*, 2001).

La caracterización e identificación de proteínas localizadas en la membrana celular de *T. cruzi*, es importante dado que presentan una amplia gama antigénica para el hospedero y cuya presencia puede variar en los diferentes estadios del ciclo de vida del parásito; su papel protector frente a la infección por *T. cruzi* en modelo murino y el reconocimiento en sueros de pacientes chagásicos (De Lima *et al.*, 2001; Snary *et al.*, 1983).

Bucio *et al.*, en 1999 estudian y comparan tres aislados mexicanos provenientes de dos vectores y una de un caso humano, donde se describen once proteínas inmunodominantes con pesos entre 212 y 25 kDa; cinco de ellos (74, 44, 31, 25 y 18 kDa) no presentaron reactividad cruzada con *Leshmania mexicana* y fueron propuestos para su empleo en el diagnóstico en México.

O'Daly en 1984, realizó un estudio donde a partir del suero de pacientes con y sin miocardiopatía chagásica, por medio de electroforesis y Western blot midiendo su reactividad con *T. cruzi* determinó componentes proteicos dominantes con pesos moleculares de 42 y 50 kDa, además identificó dos componentes de 85 y 70 kDa, de las cuales la última ha sido considerada como proteína de choque térmico.

En un estudio proteómico de *T. cruzi*, al comparar el perfil obtenido de amastigotes, tripomastigotes y epimastigotes, en estos últimos encontró 20 proteínas, de las cuales 12 de ellas con marcada relevancia en comparación con las otras dos formas del parásito. Se identificaron 29 proteínas, entre ellas algunas de choque térmico (HSP), factores de elongación, enzimas de ruta glicolítica y algunas proteínas estructurales como KMP 11, tubulina y la barra paraflagelar (Paba *et al.*, 2004).

González, en 2008, caracterizó tres aislados mexicanos, determinando que estos eran muy similares, mostrando componentes entre 150 a 13 kDa, sin presentar cruce inmunológico con sueros de pacientes de *Leshmania mexicana*.

Cura & Schijman en 2013, asociaron la estructura multiclonal poblacional de *T. cruzi* con respecto a las manifestaciones clínicas observadas en pacientes procedentes de diferentes zonas geográficas del continente Americano; reportaron, la existencia de diferentes DTU's (Unidades Discretas de Tipificación) en pacientes con manifestaciones clínicas similares, coexistencia de cepas de distintos linajes en diferentes tejidos en un mismo paciente y pacientes con distinto tipo de manifestaciones clínicas infectados por una misma DTU.

JUSTIFICACIÓN

T. cruzi es influenciado por el hospedero, lo cual se refleja en el comportamiento del parásito en los aislados provenientes de diferentes vectores o mamíferos; esto se ha observado en aislados de diversas especies de triatomíneos y regiones de un mismo país, se comportan de manera distinta al infectar al hospedero. Esto se ha observado de igual forma en los modelos *in vitro* (medio de cultivo) e *in vivo* (modelo animal). La marcada heterogeneidad del comportamiento de este parásito a nivel biológico, bioquímico y molecular se ha determinado por diferentes métodos como curvas de crecimiento en medio de cultivo y de parasitemia en modelo murino, tropismo tisular, caracterización de proteínas: concentración, perfil electroforético y secuenciación de componentes proteicos (Lima *et al.*, 2013). Por otro lado, se ha observado que la diversidad en los cuadros clínicos, se encuentra asociado a la especie del transmisor; en México el vector *T. barberi* se encuentra asociado a miocardiopatía y megacolon (Salazar-Schettino *et al.*, 1983; Salazar-Schettino *et al.*, 1984). La caracterización de cepas y los estudios comparativos, actualmente están teniendo importancia para determinar el papel que desempeña el vector sobre *T. cruzi*, especialmente respecto a la patogenicidad, virulencia, tropismo y evolución de la infección-enfermedad, se han realizado escasos estudios de caracterización biológica, bioquímica y molecular en aislados de origen mexicano.

HIPÓTESIS

Si *Trypanosoma cruzi* presenta diferencias en el comportamiento biológico y características bioquímicas cuando proviene de diversos vectores o mamíferos; entonces, estas diferencias se observarán en aislados provenientes de dos especies diferentes de vectores y en aislados obtenidos de la infección experimental cruzada entre estas especies.

OBJETIVOS

- **Objetivo General**

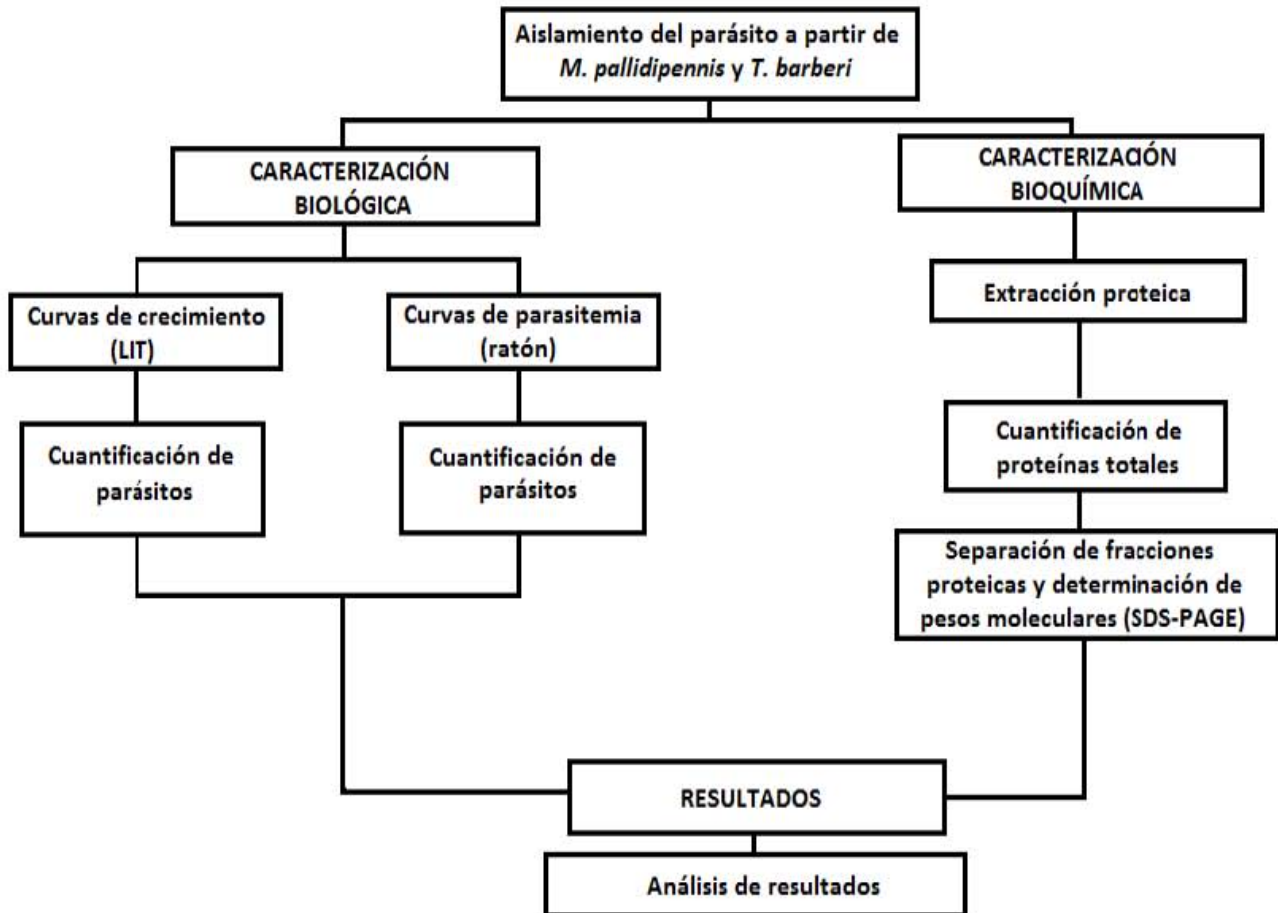
- Caracterizar el comportamiento biológico y perfil electroforético de proteínas de dos aislados de *T. cruzi* procedentes de *M. pallidipennis*, *T. barberi* y dos aislados, producto de la infección experimental cruzada entre las dos especies de triatomíneos.

- **Objetivos Particulares**

- Obtener los aislados de *T. cruzi* procedentes de *M. pallidipennis*, *T. barberi* y los obtenidos del cruce experimental entre ambas especies.
- Determinar las curvas de crecimiento de los cuatro aislados en medio de cultivo.
- Realizar las curvas de parasitemia de los cuatro aislados en modelo murino.
- Obtener los extractos proteicos de los cuatro aislados.
- Determinar la concentración proteica de los cuatro extractos.
- Determinar el patrón proteico mediante SDS-PAGE de los cuatro extractos.

4. METODOLOGÍA

4.1 Diseño experimental



4.2 Aislados de *Trypanosoma cruzi*

Los aislados estudiados se obtuvieron de las deyecciones de triatomíneos infectados con *T. cruzi*, dos procedentes de *M. pallidipennis* y *T. barberi* y dos productos de la infección cruzada de estas especies (Tabla 5).

Tabla 5. Nombre y procedencia de aislados de *T. cruzi*

Etiquetado del aislado	Especie del triatomino	Aislados estudiados
Morelos (ITRI/12/MX/Morelos)	<i>Meccus pallidipennis</i>	Obtenido originalmente de <i>Meccus pallidipennis</i> del Estado de Morelos
Mor/Tb (ITRI/14/MX/Mor/Tb)	<i>Triatoma barberi</i>	Producto de la infección de <i>Triatoma barberi</i> con el aislado proveniente de <i>Meccus pallidipennis</i> (Morelos)
Querétaro (ITRI/13/MX/Querétaro)	<i>Triatoma barberi</i>	Obtenido originalmente de <i>Triatoma barberi</i> del Estado de Querétaro
Qro/Mp (ITRI/14/MX/Qro/Mp)	<i>Meccus pallidipennis</i>	Producto de la infección de <i>Meccus pallidipennis</i> con el aislado proveniente de <i>Triatoma barberi</i> (Querétaro)

4.3 Determinación de curvas de crecimiento

Para cada aislado, se inocularon 1×10^6 parásitos en 3 ml de medio de cultivo LIT enriquecido con SFB (Suero Fetal Bovino) al 10% y se incubaron a 28°C. La cuantificación de parásitos (epimastigotes), se realizó en cámara de Neubauer, para lo cual se tomaron 10 μ L de cada tubo en dilución 1:100 con PBS cada 24 horas durante 30 días. El número de parásitos se expresó en millones de parásitos/mL, las curvas se realizaron por triplicado. El día de la inoculación se consideró como día cero.

4.4 Determinación de curvas de parasitemia

Se utilizaron 10 ratones hembra cepa CD-1 con pesos entre 15 y 20g; el inóculo fue de 1×10^6 parásitos por vía intraperitoneal para cada aislado; al ratón testigo se le inoculó solución salina estéril. La observación y cuantificación de parásitos (trípomastigotes

sanguíneos) se realizó en sangre obtenida mediante corte de la porción distal de la cola del ratón. El conteo se realizó cada tercer día, en cámara de Neubauer con 10µL de sangre en dilución 1:10 y 1:100 con citrato de sodio (3.8%); la parasitemia se cuantificó hasta la muerte del ratón o ausencia del parásito en sangre durante 30 días, tiempo en el que se sacrificaron los ratones con la extracción de cerebro, corazón, esófago, hígado, bazo y gastrocnemio; cada órgano fue identificado y se colocaron en solución de formaldehído amortiguado para su posterior estudio histoquímico e histopatológico (Salazar *et al.*, 1975; Monteiro *et al.*, 2012). El día de la inoculación se tomó como día uno. De forma rutinaria se realizaron observaciones de los ratones infectados en comparación con los testigo, especialmente en cuanto a erizamiento del pelo, disminución o pérdida de la movilidad de patas traseras así como tamaño de órganos al momento de la extracción de los mismos.

4.5 Extracción proteica

Los parásitos de los cuatro aislados se expandieron en 250mL de medio LIT, se cosecharon al iniciar la fase estacionaria de crecimiento, se realizaron cinco lavados con amortiguador de fosfatos (PBS) pH 7.2 a 3500 RPM (2500 g) a 4° C durante 20 min en centrifuga refrigerada (Sorvall ® modelo RT 6000 D). Se cuantifica la masa parasitaria.

Método por sonicación.

La masa parasitaria se resuspendió en una solución de Tris HCL 50 mM pH 7.4 en dilución 1:4 y se agregaron inhibidores de proteasas (Complete mini Roche ®) una pastilla por cada 10 mL de muestra. La lisis y fraccionamiento parasitario se realizó por sonicación con un procesador ultrasónico (Vibra Cell VC50); se aplicaron 7 pulsos de 60 segundos a 40 watts en baño frío (hielo/etanol). Se centrifugó a 20 000 RPM (43 000 g) por 60 min a 4°C en centrifuga refrigerada (Allegra™ 64R Centrifuge); finalmente, se separó el sobrenadante y se conservó en tubos de 1.5 ml a -40°C hasta su empleo posterior.

Método RIPA

En este método, la masa parasitaria se resuspendió en una solución de amortiguador de lisis RIPA en dilución 1:4 (Tris HCl 10mM, NaCl 150 mM, EDTA 1 mM, Triton X-100 1%, desoxicolato de sodio 0.5%, SDS 0.1% e inhibidores de proteasas, pH 7.4), se incubó con el buffer durante 30 min a temperatura ambiente y posteriormente se centrifugó a 20 000 *g* durante 10 minutos a 4°C. El sobrenadante se conservó en alícuotas de 1.5mL a -20°C hasta su análisis (Pérez-Cervera *et al.*, 2011).

4.6 Cuantificación de proteínas

La cuantificación de proteínas totales (Lowry modificado), se realizó por el método del ácido bicinónico con un reactivo comercial (Pierce ® BCA Protein Assay Kit, Thermo Scientific). Las reacciones se realizaron en placas de poliestireno de 96 pozos con fondo plano (Costar). Para las determinaciones, se construyó una curva patrón con albúmina sérica bovina con rango entre 25 y 1000 µg/mL; las muestras se cuantificaron concentradas y en diluciones 1:2 y 1:3 (PBS 1X pH 7.2), se determinó la densidad óptica en un espectrofotómetro para microplacas con filtro de 580 nm (Microplate reader Bio Rad * modelo 550).

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

El patrón electroforético y el peso molecular de los componentes de los extractos se realizó en condiciones reductoras por electroforesis en geles discontinuos de poliacrilamida, en presencia de dodecil-sulfato de sodio (SDS-10%) (Laemmli, 1970). Se prepararon los geles separadores mezclando acrilamida/ bisacrilamida (30%/0.8%) en diferentes concentraciones (10, 12.5 y 15%), amortiguador Tris 1.5 M (Tris [hidroximetil] aminometano) (Bio-Rad) pH 8.8, H₂O destilada, SDS (Sigma) al 10%, persulfato de amonio (Bio-Rad) al 10% y como catalizador Tetrametilendiamina TEMED (Bio-Rad).

Los geles concentradores se prepararon con acrilamida/ bisacrilamida (30%/0.8%) al 5% y amortiguador Tris 0.5 M (Bio-Rad) pH 6.8.

Para la preparación de la muestra se utilizó el amortiguador de muestra de Laemmli (Bio-Rad) V/V sometiéndose a ebullición en baño maría durante 5 min. El marcador de peso molecular empleado, consistió de 10 proteínas de 10 a 250 kDa (Precision Plus Protein, Bio-Rad). Se colocaron 20µg de proteína en cada pozo, y se utilizó un amortiguador de corrimiento constituido por Tris base 0.025 M (Bio-Rad), Glicina 0.192 M (Sigma) y SDS al 0.1%, pH 8.3. La electroforesis se llevó a cabo con una diferencia de potencial constante de 150V/≈1.5 h en un equipo Mini-Protean II Electrophoresis Cell (Bio-Rad). Al finaliza, los geles fueron fijados en una solución de metanol, agua, ácido acético en proporción de 5:4:1, y se tiñeron con azul de Coomassie G-250 (Bio-Rad). Los geles se leyeron en un fotodocumentador (Gel Doc™ EZ Imager Bio Rad) para determinar los pesos moleculares de los componentes.

4.8 Análisis de resultados

Los datos obtenidos en las curvas de crecimiento y de parasitemia se analizaron con el programa GraphPad Prism 5, con una t-student no pareada. Se describen el tiempo en que aparece el mayor número de parásitos en las curvas de crecimiento en medio LIT y las curvas de parasitemia y sobrevivencia en el modelo murino. Se describe la concentración proteica en µg/µL de cada aislado y por método de extracción.

5. RESULTADOS

5.1 Curvas de crecimiento

El mayor número de parásitos en el aislado Morelos se presentó el día 8 con 44×10^6 , con el aislado Mor/Tb el día 8 con 36×10^6 , el aislado Querétaro el día 9 con 22×10^6 y el aislado Qro/Mp el día 7 con 36×10^6 (Figura 5).

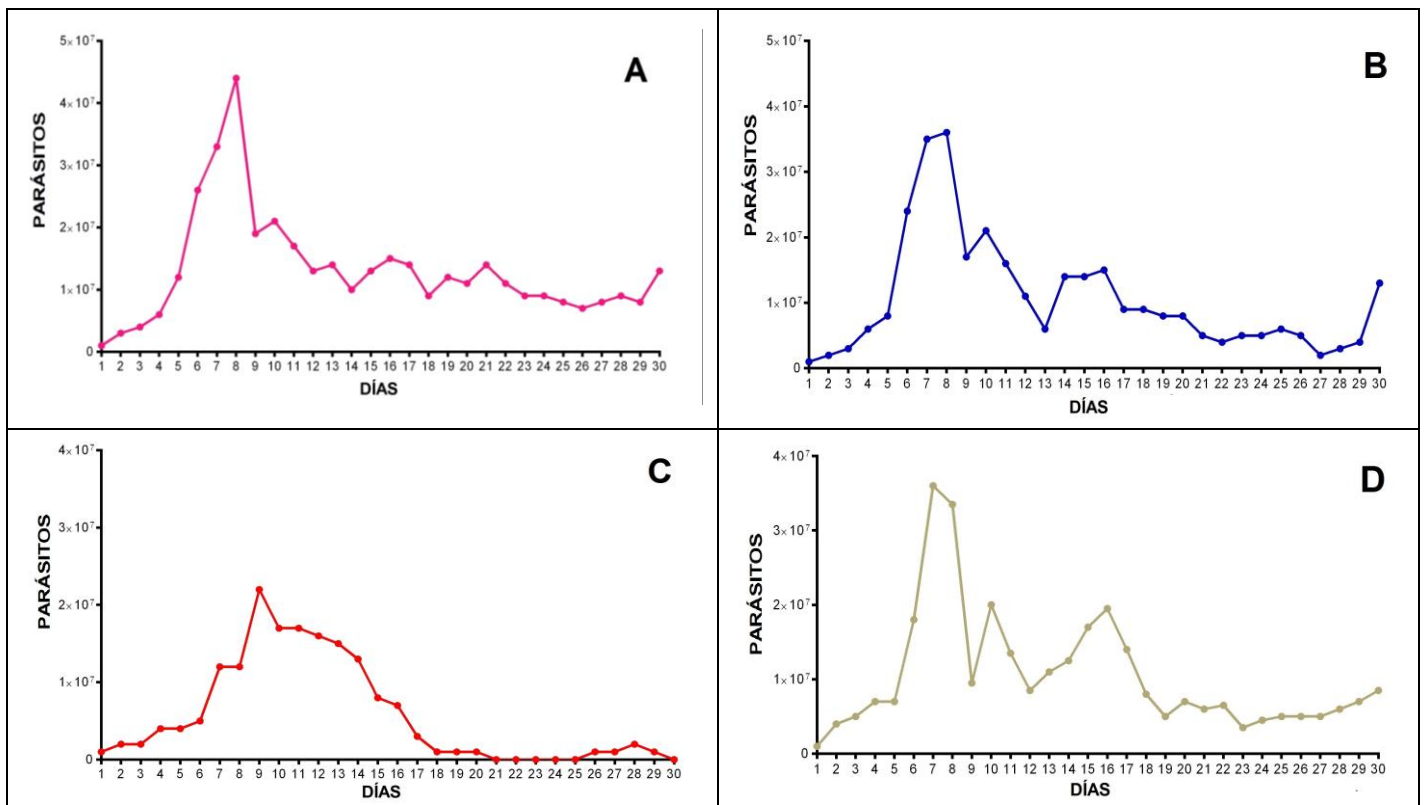


Figura 5. Curvas de crecimiento de cuatro aislados de *T. cruzi* en medio LIT. A) Morelos, B) Mor/Tb, C) Querétaro y D) Qro/Mp.

Al comparar las curvas de crecimiento de los aislados Morelos y Mor/Tb, respecto al día en que se identificó el mayor número de parásitos, se observa que en ambos se presentó el día 8, con 44×10^6 en Morelos y 36×10^6 en Mor/Tb (Figura 6).

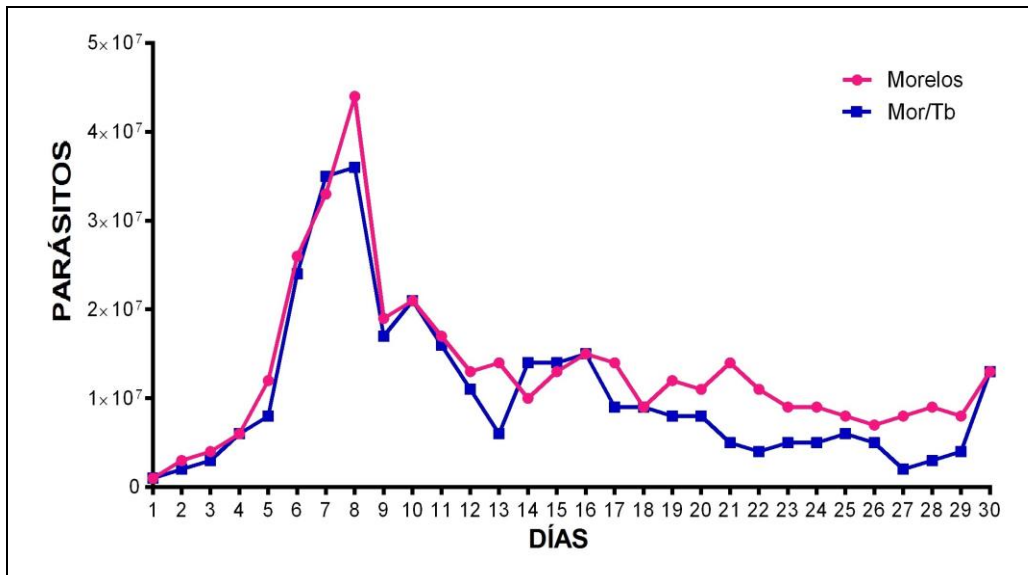


Figura 6. Curvas de crecimiento de los aislado Morelos y Mor/Tb.

Al comparar las curvas de crecimiento de los aislados Querétaro y Qro/Mp, observamos que el mayor número de parásitos se presentó el día 9 con 2.1×10^6 parásitos y el día 7 con 3.8×10^6 respectivamente, presentaron diferencia significativa ($p < 0.014$) (Figura 7).

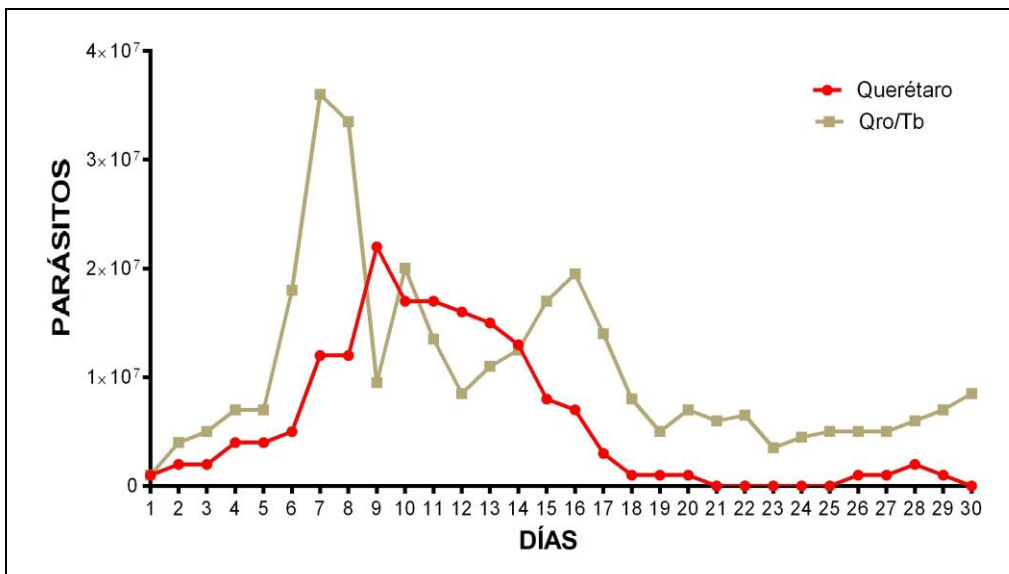


Figura 7. Curvas de crecimiento de los aislados Querétaro y Qro/Mp.

5.2 Curvas de parasitemia

El mayor número de parásitos con el aislado Morelos se observó en el día 37 con 1×10^6 parásitos y con Mor/Tb en el día 27 con 3.9×10^6 parásitos; con el aislado Querétaro en el día 15 con 2.9×10^7 parásitos y Qro/Mp en el día 15 con 3.1×10^7 parásitos, en el cual se observó un incremento de parásitos hasta 4.2×10^7 en el día 25 (Figura 8).

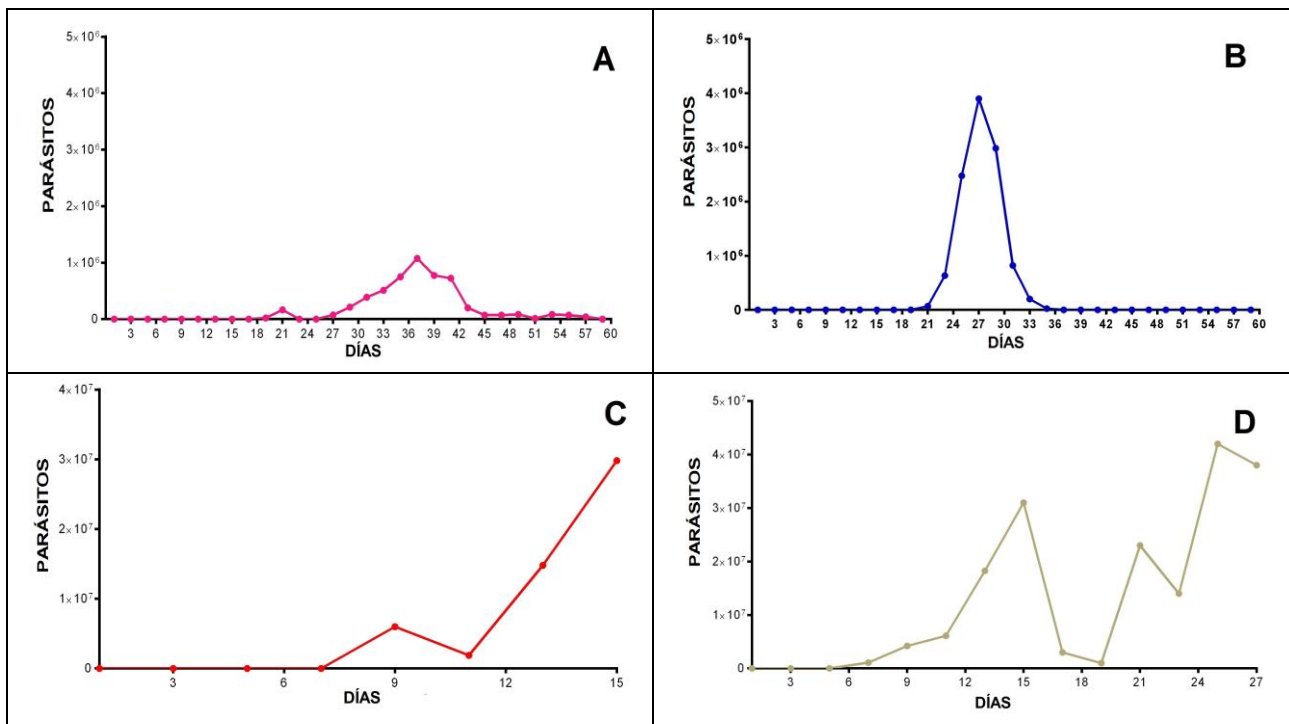


Figura 8. Curvas de parasitemia del promedio de 10 ratones infectados con cuatro aislados de *T. cruzi*. A) Morelos, B) Mor/Tb, C) Querétaro y D) Qro/Mp.

Al comparar las curvas de parasitemia de los aislados Morelos y Mor/Tb con relación al día en que se identificó el mayor número de parásitos, se observa que se presentó en el día 37 con 1×10^6 parásitos y en el día 27 con 3.9×10^6 parásitos, respectivamente. Se realizó una prueba T-student no pareada y se observó diferencia significativa ($p < 0.0001$) (Figura 9).

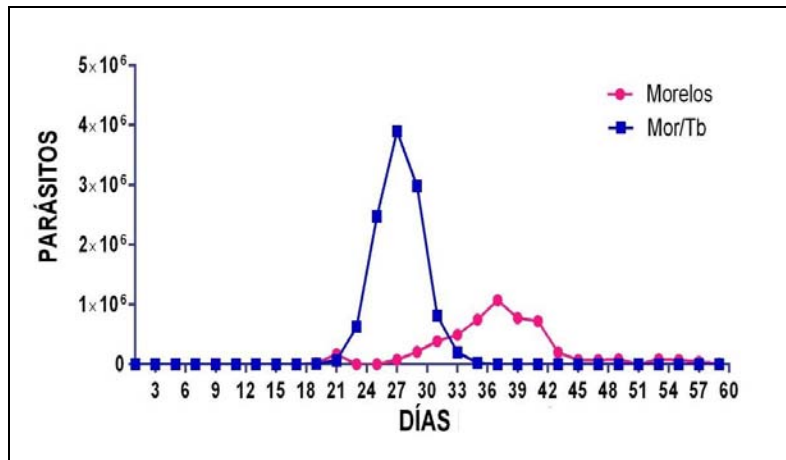


Figura 9. Curvas de parasitemia del promedio de 10 ratones infectados con los aislados Morelos y Mor/Tb.

Al comparar los aislados Querétaro y Qro/Mp en relación al día en que se identificó el mayor número de parásitos, se observó que en ambos se presenta en el día 15, con 2.9×10^7 parásitos en Querétaro y 3.1×10^7 en Qro/Mp; no presentaron diferencia significativa ($p > 0.05$) (Figura 10).

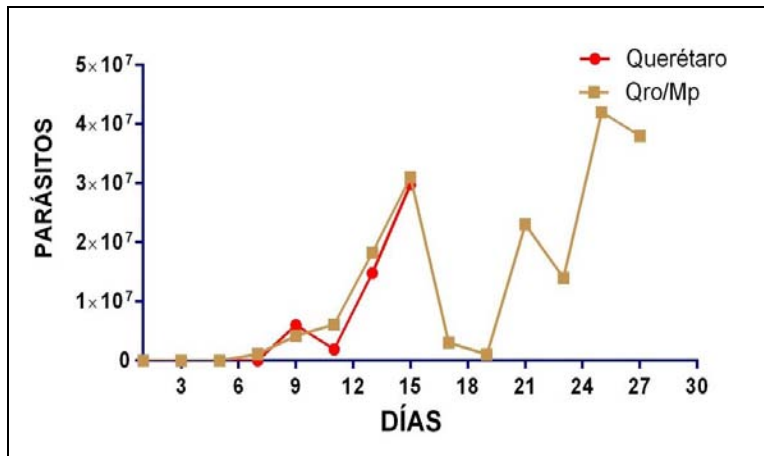


Figura 10. Curvas de parasitemia del promedio de 10 ratones infectados con los aislados Querétaro y Qro/Mp.

5.3 Curvas de sobrevivencia

El 70% (7/10) de los ratones infectados con el aislado Morelos sobrevivieron hasta el día 59 y con el aislado Mor/Tb sobrevivieron el 40% (4/10) hasta el día 59 (Figura 11).

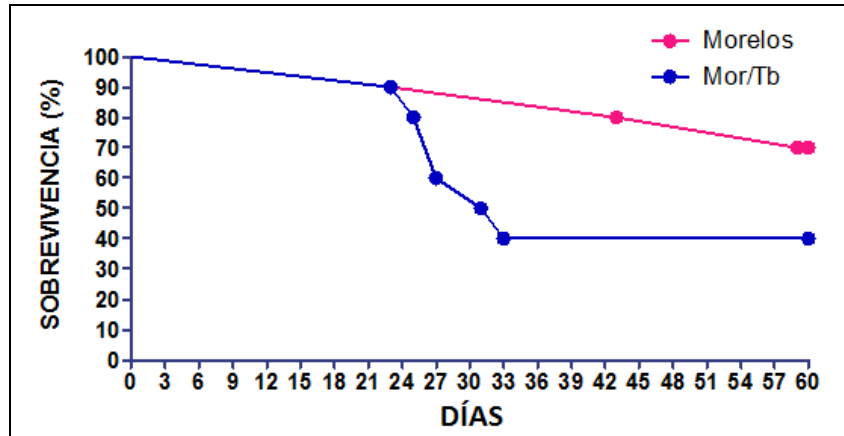


Figura 11. Curva de sobrevivencia de 10 ratones infectados con los aislados de Morelos y Mor/Tb.

Con el aislado Querétaro, el 50% (5/10) de los ratones infectados sobrevivieron hasta el día 15 y el 100% (10/10) murió el día 17. Con el aislado Qro/Mp el 40% (4/10) de los ratones sobrevivieron hasta el día 15 y el 100% (10/10) murió el día 29 (Figura 12).

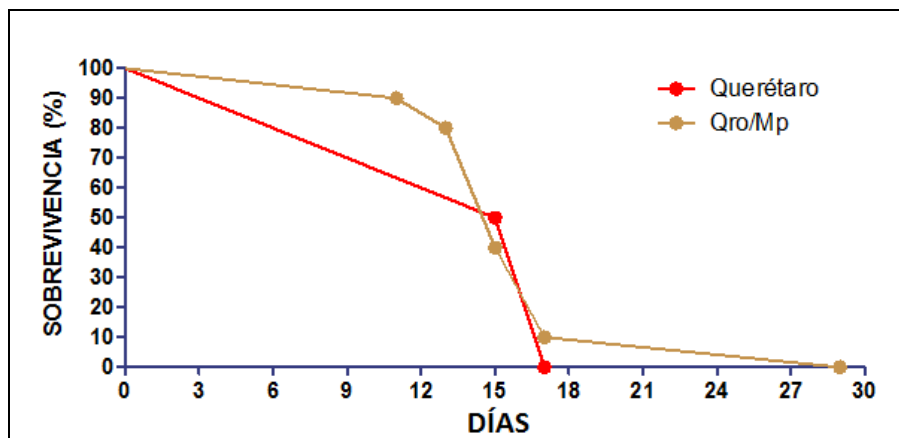


Figura 12. Curva de sobrevivencia de 10 ratones infectados con los aislados de Querétaro y Qro/Mp.

Durante la infección con los cuatro aislados, los ratones con Morelos y Mor/Tb se observaron parásitos en sangre a los 18 y 17 días, respectivamente y en los infectados con Querétaro y Qro/Mp se observaron a los 3 días. La mortalidad de los ratones infectados con los aislados Morelos y Mor/Tb fue en el día 59 con 30% (3/10) y 60% (6/10) respectivamente. La mortalidad de los infectados con los aislados Querétaro y Qro/Mp fue del 100% (10/10) a los 17 y 29 días, respectivamente. La sobrevivencia media (50%) de los ratones infectados con el aislado Morelos fue el día 82, con Mor/Tb el día 32, con Querétaro el día 16 y con Qro/Mp el día 15. La parasitemia máxima en los cuatro aislados presentó valores que fluctuaron entre 7.7 y 49 x10⁶ parásitos /mL y los valores de la parasitemia máxima promedio fueron entre 1.08 y 31 x10⁶. En las observaciones realizadas a los ratones infectados con los aislados Morelos y Mor/Tb se observó poca afectación de los cuartos traseros y en los infectados con Mor/Tb se observó aumento de tamaño en hígado y bazo. En los infectados con Querétaro y Qro/Mp se observó erizamiento del pelo y parálisis en los cuartos traseros (Tabla 6).

Tabla 6. Datos de las curvas de parasitemia de los 4 aislados

Aislado	Periodo Prepatente (día)*	Mortalidad **	Sobrevivencia media (día)***	Parasitemia Máxima****	Parasitemia Máxima Promedio*****	Observaciones*****
Morelos	18	30% (D-59)	82	7.7x10 ⁶	1.08 x10 ⁶	Poca afectación en los cuartos traseros
Mor/Tb	17	60% (D-59)	32	17x10 ⁶	3.9 x10 ⁶	Poca afectación en los cuartos traseros, aumento de tamaño en hígado y bazo
Querétaro	3	100% (D-17)	16	44x10 ⁶	29.8 x10 ⁶	Pelo erizado, parálisis de cuartos traseros
Qro/Mp	3	100% (D-29)	15	49x10 ⁶	31 x10 ⁶	Pelo erizado, parálisis de cuartos traseros

Periodo prepatente:** día donde se observaron por primera vez los parásitos en sangre después de la inoculación. *Mortalidad:** Día en que se presentó el 100% de muertes o sacrificio. *****Sobrevivencia media:** día al cual se produce el 50% de mortalidad en los ratones. ******Parasitemia máxima:** la mayor parasitemia de un ratón infectado por ese aislado. *******Parasitemia máxima promedio:** parásitos por mililitro (promedio de 10 ratones) en el día con mayor parasitemia. *******Observaciones:** se realizaron al comparar los infectados con el ratón testigo.

5.4 Cuantificación de proteínas

Al realizarse la cuantificación de proteínas en los extractos obtenidos de los 4 aislados por los métodos de sonicado y RIPA, se observó que con el método RIPA hay una mayor concentración proteica. Los aislados que tuvieron una mayor concentración proteica fueron Morelos y Qro/Mp por el método de RIPA; con el método de sonicación fueron Querétaro y Qro/Mp (Tabla7).

Tabla 7. Comparación de las determinaciones proteicas

AISLADO	Método de extracción	
	Sonicado ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)	RIPA ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)
Morelos	2.1894	3.8145
Mor/Tb	1.7793	2.4436
Querétaro	2.4229	2.6013
Qro/Mp	2.4991	3.0989

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

El perfil y los pesos moleculares (PM) de los extractos proteicos de los cuatro aislados son los siguientes:

Con el gel separador al 10%, la extracción por sonicación mostró de 8 a 10 componentes con PM entre 106 y 26 kDa. Con RIPA, de 5 a 8 componentes con PM entre 93 y 29 kDa (Figura 13A).

Con el gel separador al 12.5%, la extracción por sonicación mostró 9 componentes con PM entre 103 y 14 kDa. Con RIPA, se observaron de 6 a 8 componentes con PM entre 93 y 14 kDa (Figura 13B).

Con el gel separador al 15%, la extracción por sonicación mostró de 8 a 9 componentes con PM entre 103 y 10 kDa. Con RIPA, se observaron de 7 a 9 componentes con PM entre 74 y 11 kDa (Figura 13C).

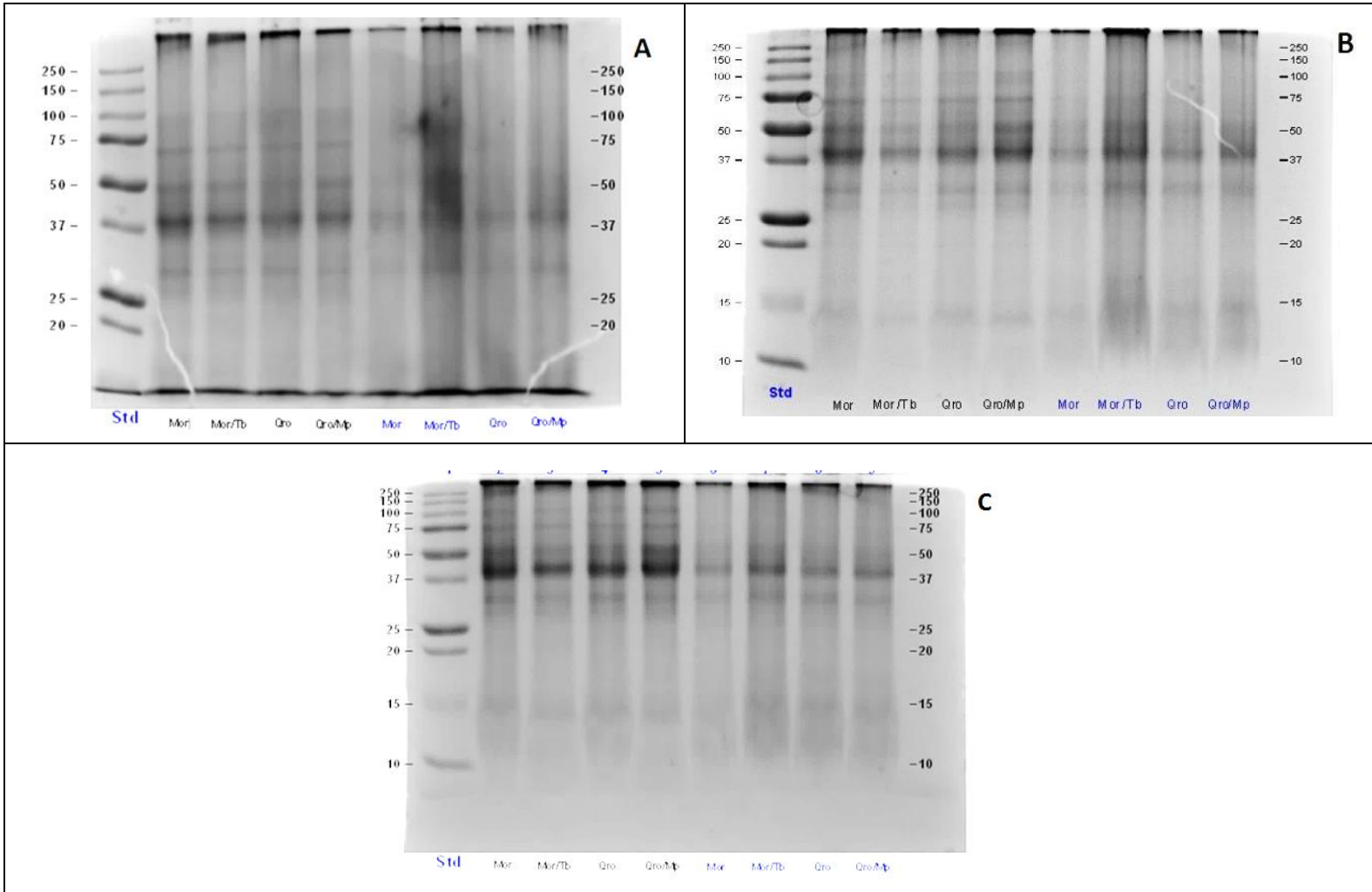


Figura 13. Patrón electroforético de 4 extractos obtenidos por sonicación y RIPA. A) Gel al 10%, B) Gel al 12.5% y C) Gel al 15%. **Std**: Marcador de pesos moleculares. 20µg de proteína por pozo. **Mor**: Morelos. **Qro**: Querétaro. **Carriles 2 - 5**: extractos obtenidos por sonicación, **6 - 9**: obtenidos por RIPA.

El análisis del patrón electroforético se realizó en gel de poliacrilamida al 12.5% (Figura 14) por ser el que muestra la mayoría de componentes con pesos moleculares entre 103 y 14 kDa. Se identificaron 9 componentes con pesos moleculares de 103, 96, 87, 72, 50, 38, 32, 28 y 14 kDa. Se observaron 5 componentes de relevancia elevada con pesos moleculares de 72, 50, 38, 32 y 14 kDa en los extractos de los 4 aislados obtenidos por ambos métodos. Se identificaron 4 componentes no compartidos (103, 96, 87 y 28 kDa) en los aislados obtenidos por sonicación (Tabla 8).

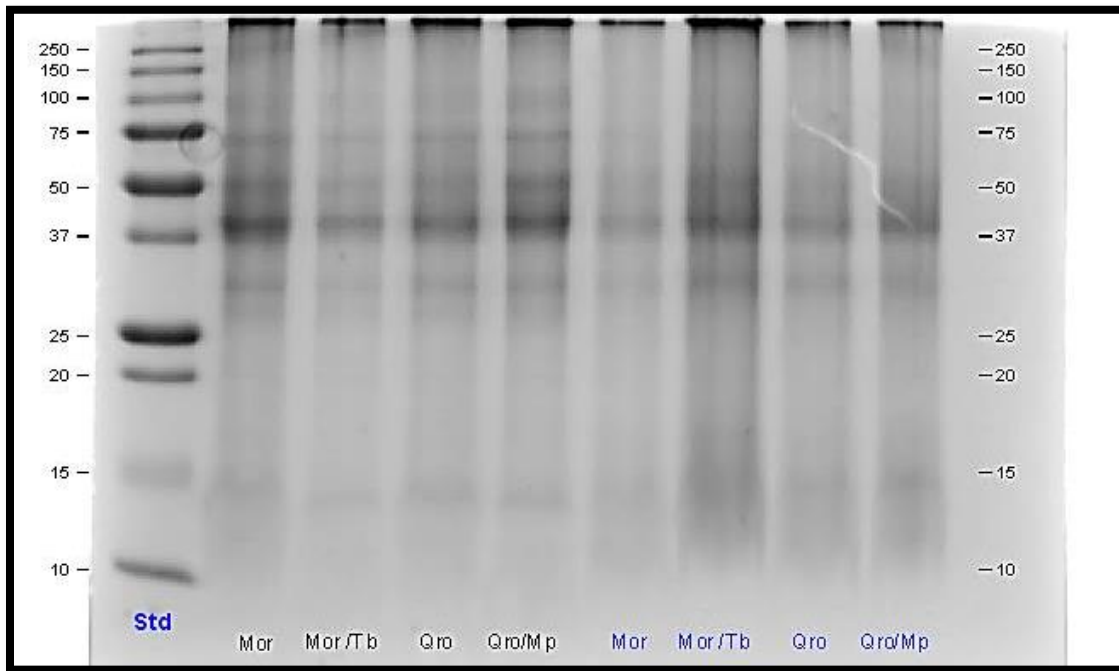


Figura 14. Patrón electroforético de los 4 extractos de *T. cruzi* obtenidos por sonicación y RIPA. Gel al 12.5%. **Std**: Marcador de pesos moleculares. 20µg de proteína/pozo. **Mor**: Morelos. **Qro**: Querétaro. **Carriles 2 - 5**: extractos obtenidos por sonicación, **6 - 9**: obtenidos por RIPA.

Tabla 8. Componentes proteicos identificados en los extractos de *T. cruzi*

PM	Sonicación				RIPA			
	Morelos	Mor/Tb	Querétaro	Qro/Mp	Morelos	Mor/Tb	Querétaro	Qro/Mp
103		+						
96	+		+	+				
87				+				
72	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
50	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
38	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
32	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
28	+	+	+	+				
14	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓

✓ : componentes proteicos presentes en los 4 aislados con ambos métodos de extracción; +: componentes proteicos no compartidos por el método de sonicación

6. DISCUSIÓN

La variabilidad en la evolución de la infección y enfermedad por *Trypanosoma cruzi* depende de múltiples factores en especial la interacción parásito-hospedero. Debido a la heterogeneidad del parásito se debe conocer el comportamiento de los aislados, para determinar las características biológicas, bioquímicas y moleculares que nos permitan proponer alternativas para el control y vigilancia de la enfermedad.

La curva de crecimiento de los cuatro aislados en el medio LIT fue similar, con el mayor número de parásitos entre los 7 y 9 días; en el aislado Morelos se presentó el día 8 con 44×10^6 parásitos/mL; en el aislado Querétaro se presentó en el día 9 con 22×10^6 parásitos/mL. Estos datos no coinciden con lo reportado por Aguilar en 2004, quien reportó un aislado (TQ) proveniente de *M. pallidipennis* del estado de Morelos que presentó el mayor número de parásitos a los 17 días con 56×10^6 parásitos/mL y con un aislado (QRO) proveniente de *T. barberi* del estado de Querétaro, el cual presentó en el día 9 el mayor número de parásitos con 36×10^6 parásitos/mL. Aún cuando son aislados provenientes de la misma zona geográfica y de las mismas especies se observan diferencias. Los aislados Querétaro y Qro/Mp presentaron diferencia significativa ($p < 0.014$) al ser comparados.

En el modelo murino también se observaron diferencias; la identificación del parásito por primera vez en sangre (periodo prepatente) en los aislados Morelos y Mor/Tb fue a los 18 y 17 días respectivamente, en comparación con los aislados Querétaro y Qro/Mp en los que se presentó a los 3 días en ambos aislados. La parasitemia máxima promedio entre los aislados Morelos y Mor/Tb fue de 1.08 y 3.9×10^6 parásitos/mL. En los aislados Querétaro y Qro/Mp fue de 29.8 y 31×10^6 parásitos/mL. Se observan diferencias en los resultados de este trabajo y el de Aguilar en 2004, ya que para el aislado proveniente *M. pallidipennis* es mayor la parasitemia máxima (44×10^6 parásitos/mL), a diferencia del aislado proveniente de *T. barberi* que fue menor (21×10^6 parásitos/mL). En este estudio el aislado obtenido de la infección del cruce experimental Mor/Tb presentó mayor número de parásitos respecto al aislado Morelos ($p < 0.0001$). Los aislados Querétaro y Qro/Mp no presentaron diferencias significativas ($p > 0.05$).

El periodo en el que se presentó la mortalidad de los ratones infectados con los aislados Morelos y Mor/Tb (60% a los 59 y 100 días), fue mayor respecto a los ratones infectados con los aislados Querétaro y Qro/Mp (100% a los 17 y 29 días), estos dos últimos aislados fueron más virulentos; Aguilar en 2004, reportó la mortalidad del 100% de los ratones infectados con un aislado proveniente de *Triatoma barberi* (QRO) el día 8. En las observaciones realizadas en los ratones infectados con Morelos, Mor/Tb, Querétaro y Qro/Mp se identificó afectación de los cuartos traseros en diferentes grados; el erizamiento del pelo se observó en los infectados con los aislados Querétaro y Qro/Mp; el aumento de tamaño en hígado y bazo, se presentó únicamente en los infectados con el aislado Mor/Tb, se observan diferencias en la apariencia y movilidad de los animales, y en el tamaño de los órganos. Salazar en 1975, en la caracterización de un aislado de *T. mazzotti* proveniente de Jalisco, observó parálisis de los cuartos traseros en los ratones infectados independientemente del número de parásitos del inóculo y la mortalidad del 100% se presentó el día 23; la mortalidad es semejante a la que presentaron los aislados Querétaro y Qro/Mp caracterizados en el presente estudio; la misma autora en 1978, caracteriza 3 aislados de *T. barberi* y uno de humano procedentes de Jalisco, en los cuales se observaron por primera vez los parásitos en los días 3-9 y la parasitemia fue de 10-25 x10⁶ parásitos/mL; en comparación con este trabajo se observó que el aislado Querétaro (*T. barberi*) y Qro/Mp los parásitos se observaron por primera vez el día 3 y la parasitemia fue mayor (29.8 y 31 x10⁶ parásitos/mL).

En otro estudio realizado por Gómez-Hernández, se caracterizaron 5 aislados, los cuales procedían de *T. longipennis*, *T. pallidipennis* y *T. picturata* (Jalisco); dos de origen humano, uno de Oaxaca (fase aguda) y otro de Guanajuato (fase crónica) y se determinó que estas cepas infectaban al 100% de los ratones, la presencia del parásito se observó por primera vez entre los días 2 al 11, la parasitemia máxima se presentó entre los días 27 y 33 con 6 a 10 x10⁶ parásitos/mL, la mortalidad fue de 3 a 53%, y se concluyó que los aislados que presentaron mayor mortalidad fueron los provenientes de triatominos (Gómez-Hernández, 2011). Los estudios realizados con diferentes aislados de origen mexicano muestran que tienen diferentes perfiles de crecimiento, parasitemia,

cambios en la apariencia en los ratones infectados, afectación de cuartos traseros y mortalidad.

En la caracterización bioquímica, se observó que con el método de extracción RIPA, se obtuvo una mayor concentración proteica que por el método de sonicación (Tabla 7); al realizar la electroforesis en geles con diferentes concentraciones (10, 12.5 y 15%) se observó que los componentes con pesos moleculares entre 93 y 103 kDa siempre se identificaron en los que fueron extraídos por el método de sonicación y con RIPA no fueron identificados. Se ha observado que puede haber diferencias en la cantidad y relevancia de componentes proteicos, lo cual puede deberse a la metodología de extracción, procesos de lavado, lisis y la adición de inhibidores de proteasas (Schechter & Nogueira, 1988; Bua *et al.*, 1990; De Lima *et al.*, 2001).

El patrón electroforético muestra componentes con pesos moleculares entre 103 y 14 kDa, entre los que destacan, por su presencia y relevancia en los cuatro aislados y con ambos procedimientos de extracción, los de 72, 50, 38, 32 y 14 kDa (Figura 14). El de 72 kDa fue descrito por Araujo en 1986, en la superficie de epimastigotes y tripomastigotes metacíclicos y en el mismo año Schechter *et al.*, lo identifican en sueros de pacientes (anti-GP72). El de 50 kDa, ha sido identificado mediante inmunoblot en sueros de pacientes con miocardiopatía Chagásica por O'Daly *et al.*, en 1994, y por Paba *et al.* en 2004 como tubulina. Los de 38 y 32 kDa coinciden con el trabajo realizado por Bucio en 1999 en extractos obtenidos de *M. pallidipennis*, *T. barberi* y de humano. Los de 72, 38 y 14 kDa fueron identificados por González en 2008 en extractos obtenidos de *M. pallidipennis*, *T. barberi* y *T. dimidiata* procedentes de los estados de Morelos, Querétaro y Veracruz, respectivamente. Algunos de los componentes que no fueron compartidos (96, 87 y 28 kDa), han sido descritos con diferente papel en *T. cruzi* (Paba *et al.*, 2004). La caracterización de componentes proteicos tiene suma importancia para establecer la relación hospedero-vector y sus repercusiones en la presentación y evolución clínica de la infección- enfermedad por *T. cruzi* en el humano.

7. CONCLUSIONES

- ✓ En el crecimiento en medio LIT, se presentó diferencia significativa entre Querétaro, con menor crecimiento parasitario respecto a Qro/Mp y los cuatro aislados mostraron la mayor cantidad de parásitos entre los días 7 a 9.
- ✓ Los aislados Querétaro y Qro/Mp fueron más virulentos que los aislados Morelos y Mor/Tb, al mostrar diferencias en el periodo prepatente, la parasitemia y el tiempo en el que se presentó la mortalidad en el modelo murino.
- ✓ Con el método de extracción RIPA se obtuvo una mayor concentración de proteínas.
- ✓ Con el método de sonicación se identificaron nueve componentes con pesos moleculares entre 103 y 14 kDa. Con el método RIPA, 8 componentes con pesos moleculares entre 93 y 14 kDa.
- ✓ Se identificaron 5 componentes compartidos con peso molecular de 72, 50, 38, 32 y 14 kDa en los extractos de los cuatro aislados obtenidos con ambos métodos de extracción.
- ✓ Se identificaron 4 componentes no compartidos con peso molecular de 103, 96, 87 y 28 kDa en los extractos proteicos obtenidos mediante sonicación.

8. PERSPECTIVAS

Continuar con la caracterización biológica de los cuatro aislados en el modelo murino mediante estudios histo-patológicos de los órganos extraídos, con el propósito de identificar tropismo tisular, cuantificación de nidos de amastigotes, proceso inflamatorio y presencia de fibrosis.

Determinar y caracterizar los componentes proteicos utilizando electroforesis de doble dimensión, afinidad a lectinas y secuenciación de masa peptídica para correlacionar su papel en el parásito y posible participación en la evolución del proceso infección-enfermedad por *T. cruzi*.

9. BIBLIOGRAFÍA

- Aguilar JH. Caracterización biológica e inmunoquímica de cuatro aislados de *Trypanosoma cruzi*. Tesis para obtener el título de biólogo. Facultad de Ciencias, UNAM. 2004.
- Araujo FG & Remington JS. Characterization of stage and strains of *Trypanosoma cruzi* by analysis of cell membrane components. *Journal of Immunology*. 1981; 127(3):855-859.
- Argolo A, Felix M, Pacheco R, Costa J. Doença de Chagas e seus Principais Vetores no Brasil. Imperial Novo Milênio. Rio de Janeiro. 2008.
- BID, OPS, IDRC, & CNZ. Programa Regional para el Control de la Enfermedad de Chagas en América Latina. Iniciativa de Bienes Públicos Regionales. Ed. BID. 2010.
- Brener Z. Biology of *Trypanosoma cruzi*. *Annu Rev Microbiol*. 1973; 27:347-382.
- Bua JE, Bontempi EJ, Ruiz AM, Segura EL. Antigens in *Trypanosoma cruzi*. *Rev Argent Microbiol*. 1990; 22:37-55.
- Bucio MI, Cabrera M, Segura EL, Zenteno E, Salazar-Schettino PM. Identification of immunodominant antigens in mexican strains of *Trypanosoma cruzi*. *Immunological Investigations*. 1999; 28(4): 257-268.
- Buenos Aires: Ministerio de Salud de la Nación. Guías para la atención al paciente infectado con *Trypanosoma cruzi* (Enfermedad de Chagas), 2012.
- Calderón-Arguedas O, Chinchilla M, García F, Vargas M. Variaciones biológicas de *Trypanosoma cruzi* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) asociadas con la digestión de diferentes tipos de sangre por el vector *Triatoma dimidiata* (Hemiptera: Reduviidae). *Parasitol Latinoam*. 2003; 58: 3-10.
- Carabarin Lima A, González Vázquez MC, Baylon Pacheco L, Rosales Encina JL. Enfermedad de Chagas: una enfermedad olvidada. *Elementos*. 2011; 84:5-11.
- Chagas C. Nova tripanozomíase humana. Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp., agente etiologico de nova entidade morbida do homem. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1909; 1:159-218.
- Cura C & Schijman AG. Relación entre los genotipos de *T. cruzi* y la presentación clínica de la enfermedad de Chagas. *Rev. Esp. Salud Pública*. 2013; 96:9-16.

- De Lima AR, Farias MN, Tortolero E, Navarro MC, Contreras VT. Partial purification and use of *Trypanosoma cruzi* glycosidic fractions for Chagas disease diagnosis. *Acta Cient Venez.* 2001; 52:235-47
- De Souza W. Cell biology of *Trypanosoma cruzi*. *International Review of Cytology.* 1984; 86:197-273.
- Devera R, Fernandez O and J Rodriguez Coura. 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.* 2003; 98(1):1-12
- Díaz-Lima E, Escalante H, Jara CA. Niveles de parasitemia y alteraciones histológicas en *Mus musculus* BALB/c infectado con *Trypanosoma cruzi* obtenido de *Panstrongylus chinai* del Valle Chamán, La libertad – Perú. *Parásitol Latinoam.* 2004; 59:153-158.
- DNDi: Drugs for Neglected Disease *initiative.* 2014. Chagas Disease. Disponible en: <http://www.dndi.org/diseases-projects/diseases/chagas.html>
- Ferreira M, Silistino-Souza R, Varella-Garcia M, Azeredo-Oliveira TV, Silva AE. Biologic and Genetics Aspects of Chagas Disease at Endemic Areas. *Journal of Tropical Medicine.* Volume 2012, Article ID 357948, 11 pages doi:10.1155/2012/357948.
- Garcia E, Genta FA, De Azambuja P, Schaub G. Interactions between intestinal compounds of triatomines and *Trypanosoma cruzi*. *Trends in Parasitology.* 2010; 26:499-505.
- Gómez-Hernández C, Rezende-Oliveira K, Nogueira Nascentes GA, Rocha Batista L, Borges Kappel H, Martinez-Ibara A, Trujillo Contreras F, Lages-Silva E, Ramirez LE. Molecular characterization of *Trypanosoma cruzi* Mexican strains and their behavior in the mouse experimental model. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2011; 44(6):684-690.
- Gonzalez L. Caracterización bioquímica de tres componentes glicoprotéicos de tres aislados mexicanos de *Trypanosoma cruzi*. Tesis de Maestría. Biología. Facultad de Ciencias, UNAM. 2008.

- Guzmán-Marin ES, Zavala-Castro JE, Acosta-Viana KY, Rosaldo-Barrera ME. Importancia de la caracterización de cepas de *Trypanosoma cruzi*. Rev Biomed. 1999; 10:177-184.
- Hernández R, Herrera J, Bosseno MF, Brenière SF and B Espinoza. *Trypanosoma cruzi*: Data supporting clonality in Mexican Stocks. J Parasitol. 2001; 87(5):1178-1181.
- Jurberg J & Galvo C. Biology, ecology, and systematics of Triatominae (Heteroptera, Reduviidae), vectors of Chagas disease, and implications for human health. Neu Serie, 2006; 50: 10096-1116.
- Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970; 227: 680-5
- Levine ND, Corliss JO, Cox FE, Deroux G, Grain J, Honiberg BM, Leedale GF, Loeblich AR, Lom J, Lynn D, Merinfeld EG, Poljansky G, Sprague V, Vavra J, Wallace FG. A newly revised classification of protozoa. The Journal of Protozoology. 1980; 27: 37-58.
- Lima FM, Souza RT, Santori FR, Santos MF, Cortez DR, Barros RM, Cano MI, Silva HM, Macedo M, Mostara RA, De Silveira JF. Interclonal Variations in the Molecular Karyotype of *Trypanosoma cruzi*: Chromosome Rearrangements in a Single Cell-Derived Clone of the G Strain. PLoS One. 2013; 8(5): e63738.
- McConville M, Mullin KA, Ilgoutz SC, Teasdale RD. Secretory pathway of trypanosomatid parasites. Molecular and biology reviews. 2002; 66(1): 122-154.
- Monteiro WM, Costa Magalhães LK, Costa Oliveira J, De Olivera Guerra JA, Silveira H, De Lima Ferreira LC, De Ornelas Toledo MJ, Vale Barbosa MG. Biological behavior of *Trypanosoma cruzi* stocks obtained from the States of Amazonas, Western Brazilian Amazon, in mice. Rev Soc Bras Med Trop. 2012; 45(2):209-214.
- Monteón V, Gódinez S, Cruz G, Blames J, López J, Hernández O. Caracterización biológica de aislados mexicanos de *Trypanosoma cruzi*: metaciclo génesis parasitemia y resistencia contra benznidazol. Rev Biomed. 2009; 20:206-214.
- O'Daly JA, Carrasco H, Fernández V, Rodríguez MB. Comparison of chagasic and non-chagasic myocardopathies of *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli*. Acta Tropica. 1994; 56: 265-287.

- OMS. 62ª Asamblea Mundial de la Salud. Punto 12.12, Orden del Día Provisional, 20 de marzo de 2009. Enfermedad de Chagas: control y eliminación. OMS/A62/17/2009).
- OMS. (2013). La enfermedad de Chagas (tripanosomiasis americana). Retrieved March 08, 2014, from <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/es/>
- Paba J, Santana JM, Teixeira AR, Fontes W, Sousa MV, Ricart CA. Proteomic analysis of the human pathogen *Trypanosoma cruzi*. *Proteomics*. 2004; 4:1052-1059.
- Pérez-Cervera Y, Harichaux G, Schmidt J, Debierre-Grockiego F, Dehennaut V, Bieker U, Meurice E, Lefebvre T, Schwarz RT. *Direct evidence of O-GlcNAcylation in the apicomplexan Toxoplasma gondii: a biochemical and bioinformatic study*. *Amino Acids*. 2011; 40(3):847-856.
- Rassi AJ, Rassi A, Marcondes J. American Trypanosomiasis (Chagas Disease). *Infect Dis Clin*. 2012; 26:275-291.
- Salazar PM, Tay J, Navarrete F, Ramos S. Comportamiento en el ratón de una cepa mexicana de *Trypanosoma cruzi* de peculiar virulencia. *Rev Inv Salud Pública*. 1975; 35:37-45.
- Salazar-Schettino PM, Jiménez J, Tay J, Cárdenas L. Estudio comparativo de la patogenicidad de cuatro cepas de *T. cruzi* en el ratón blanco. *Rev Lat-amer Microbiol*. 1978; 20:51-57.
- Salazar-Schettino PM, Tay J, Ontiveros A, Jiménez J, Haro I de, Bucio MI, Ruiz Hernández AL. Enfermedad de Chagas en México. Presentación de casos clínicos. *Rev Fac Med UNAM*. 1983; 26: 11-51.
- Salazar-Schettino PM, Tay J, Bucio MI, Haro I de, Anzures ME, Flores AG. Primer caso de megaesófago con serología positiva a *Trypanosoma cruzi*. *Salud Pública Méx*. 1984; 26: 452-455.
- Salazar PM, Haro I, Carera M. Tres especies de triatomíneos y su importancia como vectores de *Trypanosoma cruzi* en México. *Medicina*. 2005; 65:63-69.
- Salazar PM, Rojas-Wastavino GE, Cabrera-Bravo M, Bucio-Torres MI, Martínez-Ibarra A, Moroy-Escobar MC, Rodas-Retana A, Guevara-Gomes Y, Veneces-Blanco MO, Ruiz-Hernandez AL, Torres-Gutiérrez E. Revisión de 13 especies de la familia

Triatominae (Hemiptera: Reduviidae) vectores de la enfermedad de Chagas, en México. *J Selva Andina Res Soc.* 2010; 1(1):57-80.

- Schechter M & Nogueira N. Variations induced by different methodologies in *Trypanosoma cruzi* surface antigen profiles. *Mol Biochem Parasitol.* 1988; 29: 37-45
- Schmunis GA. Epidemiology of Chagas disease in non-endemic countries: the role of international migration. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2007; 102(1):73-85.
- Secretaría de Salud: CENAPRECE (Centro Nacional de Programas Preventivos y Control de Enfermedades) 2014, SINAVE (Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica) 2014, SINAIS Sistema Nacional de Información en Salud), SUIVE (Sistema Único de Información y Vigilancia Epidemiológica), 2014.
- Snary, D. Cell surface glycoproteins of *Trypanosoma cruzi*: protective immunity in mice and antibody levels in human chagasic sera. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene.* 1983; 77(1): 126-129.
- Snary D. The cell surface of *Trypanosoma cruzi*. *Current Topics in Microbiology and Immunology.* 1985; 117:76-92.
- Suarez N, Cabrera R, Cartagena L, Ayaqui R. Características biológicas de una cepa de *Trypanosoma cruzi* en un modelo murino y análisis de supervivencia. *Rev Peru Med Exp Salud Pública.* 2009; 26(2):187-192.
- Tay J, Salazar PM, Ontiveros D. El comportamiento en el ratón blanco de una cepa de *Trypanosoma cruzi* mediante pases sucesivos en diferentes especies de triatomíneos. *Rev Lat.-Amer. Microbiol Parasitol.* 1969; 11:78-89.
- Tay J, Guitiérrez M, Salazar PM, Castillo M, Ortega M. Estudio sobre seis cepas mexicanas de *Trypanosoma cruzi*. *Rev Inv Salud Publica.* 1973; 33:67-76.
- Tay J, col. Evolución del *Trypanosoma cruzi* cepa mexicana en el huésped vertebrado, invertebrado e in vitro. *Sal Púb Méx.* 1980; 22:513-520.
- Tibayrene M and F Ayala.. Isoenzyme variability in *Trypanosoma cruzi*, the agent of Chagas' disease: genetical, taxonomical and epidemiological significance. *Evolution.* 1988; 42: 277-292.
- Toso A, Vial F, Galanti N. Transmisión de la enfermedad de Chagas por vía oral. *Rev Med Chile* 2011; 139:258-266.

- UNAM, F. de M., & OPS, O. *Manual para el Diagnostico de la Infección por Trypanosoma cruzi* Mexico: OPS/OMS. 2006. p. 45.
- Valamiel de Olivera e Silva JC, Machado de Assis GF, Tavares de Olivera M, Silva Valadares HM, Faria de Valle I, Nogueira de Paiva NC, Rodrigues Martins H, De Lana M. Molecular and biological characterization of *Trypanosoma cruzi* strains isolated from children from Jequitinhonha Valley, State of Minas Gerais, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2013; 46(4):433-440.
- WHO. Control of Chagas Disease. Second Report of the WHO expert committee. World Health Organization, Geneva. 2002.
- WHO. Working to overcome the global impact of neglected tropical diseases First WHO report on neglected tropical diseases. *World Health*, 86, 186. 2010. Retrieved from http://whqlibdoc.who.int/publications/2010/9789241564090_eng.pdf.
- Zingales B, Andrade SG, Briones MRS, Campbell DA, Chiari E, Fernandes O, et al. A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2009; 104(7):1051-1054.