



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

"OBTENCION DE CLONAS DE
Trypanosoma cruzi A PARTIR DE TRES
AISLADOS MEXICANOS, UN
ESTUDIO IN VIVO"

TESIS

Que para obtener el título de
QUIMICA FARMACEUTICO BIOLOGA
presenta

CATALINA ELIZALDE MENDOZA



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

México, D.F.



EXAMEN DE PROFESIONALES
FACULTAD DE QUIMICA
1999

269747



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.

PS

JURADO ASIGNADO SEGUN EL TEMA

| | |
|---------------------|-------------------------------------|
| Presidente | Prof. Biserka Sveshtarova Pekarkova |
| Vocal | Prof. Abel Gutiérrez Ramos |
| Secretario | Prof. Marco Antonio Becerril Flores |
| 1er Suplente | Prof. Maite Astigarraga Zavaleta |
| 2o Suplente | Prof. Marco Antonio Ortiz Jiménez |

Este trabajo se realizó en el laboratorio Biología de Parásitos a cargo de la Dra. Paz María Salazar Schettino, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, México.

Asesor


M. en C. Marco A. Becerril Flores

Sustentante


Catalina Elizalde Mendoza

Deseo dedicar esta tesis muy especialmente:

- **A mis padres**, con todo mi amor:

Sra. Bertha Mendoza D. y Sr. Humberto Elizalde L.

No hay forma para agradecer todo su apoyo, sacrificio, amor, confianza, amistad y fe.

Este es sólo un paso para llegar a ser una mujer.

- **A mis hermanos :**

Ara, Paty, Lily, Lalo, Irma y Beto

Gracias por todo lo que me brindan.

Son indispensables en mi vida; sinceramente me siento muy orgullosa y feliz de tenerlos como hermanos.

¡ No lo hubiera logrado sin su presencia !

A Dios,

A la UNAM y a la Facultad de Química.

Mi especial agradecimiento a:

**DIPREC S.A.
Arq. Alfredo Castelló Durán
Dr. Ricardo Ortíz Freyre**

**Por todas las facilidades y apoyo
brindado al presente estudio
para su conclusión.**

AGRADECIMIENTOS

Siempre toda mi gratitud a cada uno de los seres que intervienen con su fuerza y apoyo bajo todas las circunstancias a lo largo de mi vida; muy especialmente, en éste momento. El saber éste trabajo entre sus manos, lo hace un logro aún más importante para mí. Todos ocupan un lugar permanente en mi mente y en mi corazón. ¡ Los quiero mucho!

Marco Antonio:

Haber trabajado juntos, ha sido toda una experiencia; no tengo palabras para expresarte mi gratitud por todo lo que compartimos, tus consejos y apoyo en todo momento. Me enseñaste más de lo que imaginas, estoy orgullosa de tener un maestro como tú; pero lo que me hace realmente sentirme especial, es saber que eres mi amigo. ¡ Finalmente lo logramos !

- **José Hernández,**

Mil Gracias por todo lo que me sería imposible expresarte con palabras; ésta tesis también es tuya.

- **Noemi...**

Eres sencillamente mágica. Gracias por todo. Te admiro y quiero muchísimo !!!

- **Mis amigos:**

Abelardo, Adriana, Carlos, Dulce, Edgar, Eréndira, Gina, Isela, Jerry, Lenin, Leonel, Lindy, Mónica, Sergio y Roberto.

Gracias por acompañarme a lo largo de mi vida, haciéndola todavía más plena con su cariño y amistad.

- **... Y mi especial y enorme agradecimiento y cariño por siempre para mis profesores:**

Alfonso Lira, Enrique Bravo, Rafael Rión y Jorge Paniagua. Gracias por permitirme aprender y disfrutar de su interminable talento y experiencia.

INTRODUCCION

El **protozooario** hemoflagelado Trypanosoma cruzi es el agente etiológico de la Enfermedad de Chagas, una entidad clínica importante como causa de **morbilidad y mortalidad** en el centro y sur de América²³. Estudios seroepidemiológicos de 1992 realizados en América Latina, indican una prevalencia global de 16 a 18 millones de individuos infectados con T. cruzi, y al menos 90 millones de personas se encuentran en riesgo de contraer la infección.^{21,24,34}

Esta enfermedad puede ser transmitida al hombre por transfusión sanguínea, vía oral, transplacentaria, conducto de la leche materna, transplante de órganos, inoculación accidental en el laboratorio y, en forma natural, mediante las deyecciones de una clase de insectos hematófagos denominados **triatóminos**.

Para su estudio, T. cruzi ha sido aislado de diferentes regiones geográficas a partir de diferentes fuentes: humanos, **reservorios** y **transmisores**. Mediante diversos estudios, se ha demostrado que las cepas obtenidas de éste **parásito**, aún cuando presentan morfología similar y el mismo ciclo de vida, difieren en su manifestación de **virulencia** y **patogenicidad**. Por otro lado, también se ha demostrado que una **cepa** de T. cruzi puede estar formada por una población heterogénea de organismos, los cuales pueden presentar un comportamiento diferente a la población de la cual fueron obtenidos en cuanto a sus características de **infectividad**, **patogenicidad**, morfología, **virulencia**, **tropismo** tisular, **patrones antigénicos** y perfiles isoenzimáticos^{19, 23, 35}.

En México, a la fecha no se habían realizado estudios con poblaciones clonadas de T. cruzi. Con base en las consideraciones mencionadas, surge la idea de obtener una técnica de clonación eficaz para **aislados** mexicanos, así como estudiar comparativamente el comportamiento biológico in vivo de las **clonas** obtenidas. Para este efecto se emplearon los **aislados** mexicanos:

Acamilpa, Yucatán, y Querétaro; los cuales se obtuvieron de **reservorios** y localidades diferentes.

El estudio se dividió en diez actividades principales: 1) Determinación del comportamiento in vivo de los **aislados**, 2) Obtención de tripomastigotes sanguíneos, 3) Técnica de **clonación** por dilución limitante a partir de tripomastigotes sanguíneos, 4) Obtención de tripomastigotes sanguíneos purificados, 5) Técnica de **clonación** por dilución limitante a partir de tripomastigotes sanguíneos purificados, 6) Técnica de **clonación** por dilución limitante a partir de epimastigotes, 7) Técnica de **clonación** por crecimiento y aislamiento de colonias sobre medio sólido, 8) Técnica modificada de **clonación** por formación de colonias y crecimiento en agar 9) Obtención de clonas por la técnica de **clonación** más eficaz y, 10) Determinación del comportamiento clonal in vivo.

Las **clonas** de T. cruzi han resultado ser útiles en su propio estudio. Provenientes de una misma célula, representan genotípicamente una población homogénea de organismos, por lo que han demostrado representar el material de elección para estudios comparativos de constitución antigénica, genética y el modelo ideal para la elaboración de pruebas de fármacos antiparasitarios para T. cruzi.^{10,25,36}

De varias partes del mundo se han reportado estudios variados con poblaciones clonadas de T. cruzi. Con este estudio pretendemos establecer la base de estudios con **clonas** de **aislados** mexicanos posteriores de mayor especificidad que nos conduzcan a conocer ampliamente al **protozoo**; esfuerzos que conjuntamente con otras investigaciones al final nos lleven a un mayor conocimiento del **parásito** para de esta forma contribuir al objetivo principal la preservación de la salud y la disminución de los índices de **mortalidad** y **morbilidad** actuales de la Enfermedad de Chagas.

INDICE

| | |
|---|----|
| I. ANTECEDENTES | 1 |
| I.1 IMPORTANCIA EN SALUD PUBLICA DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS1 | |
| I.2 EL AGENTE ETIOLOGICO | 4 |
| I.2.1 FASES EN SU CICLO DE VIDA | 4 |
| I.2.2 CICLO BIOLOGICO | 6 |
| I.3. LA ENFERMEDAD DE CHAGAS | 8 |
| I.3.1. MECANISMOS DE TRANSMISION E INFECCION DE <i>T. cruzi</i> | 8 |
| I.3.2. MECANISMOS DE PATOGENICIDAD DE <i>T. cruzi</i> | 10 |
| I.4. HETEROGENEIDAD BIOLOGICA DE <i>T. cruzi</i> | 16 |
| I.4.1. CARACTERIZACION DE <i>T. cruzi</i> | 18 |
| I.5. TEORIA CLONAL DE <i>T. cruzi</i> | 27 |
| I.5.1 IMPORTANCIA DE LAS POBLACIONES CLONADAS | 28 |
| II. OBJETIVOS | 29 |
| III. HIPOTESIS | 30 |
| IV. MATERIAL Y METODOS | 31 |
| IV.1. DETERMINACION DEL COMPORTAMIENTO <i>IN VIVO</i> DE LOS AISLADOS | 33 |
| IV.2. OBTENCION DE TRIPOMASTIGOTES SANGUINEOS | 35 |
| IV.3 CLONACION POR DILUCION LIMITANTE A PARTIR DE TRIPOMASTIGOTES SANGUINEOS (DILUCION LIMITANTE 1) | 35 |
| IV.4. PURIFICACION DE TRIPOMASTIGOTES SANGUINEOS | 35 |
| IV.5 CLONACION POR DILUCION LIMITANTE A PARTIR DE TRIPOMASTIGOTES SANGUINEOS PURIFICADOS (DILUCION LIMITANTE 2) | 38 |
| IV.6 CLONACION POR DILUCION LIMITANTE A PARTIR DE EPIMASTIGOTES (DILUCION LIMITANTE 3) | 38 |
| OBTENCION DE EPIMASTIGOTES | 39 |

| | |
|--|----|
| IV.7 CLONACION EN PLACA A PARTIR DE EPIMASTIGOTES | 40 |
| IV.8 OBTENCION DE CLONAS POR LA TECNICA DE CLONACION MAS EFICAZ..... | 42 |
| IV.9 DETERMINACION DEL COMPORTAMIENTO CLONAL <u>IN VIVO</u> | 43 |
| V. RESULTADOS | 45 |
| V.1. COMPORTAMIENTO <u>IN VIVO</u> DE LOS AISLADOS | 45 |
| V.2. DILUCION LIMITANTE 1 | 50 |
| V.3. PURIFICACION DE TRIPOMASTIGOTES SANGUINEOS | 50 |
| V.4. DILUCION LIMITANTE 2 | 52 |
| V.5. DILUCION LIMITANTE 3 | 53 |
| V.6. CLONACION POR CRECIMIENTO Y AISLAMIENTO DE COLONIAS SOBRE MEDIO SOLIDO..... | 55 |
| V.7. TECNICA DE CLONACION MODIFICADA POR FORMACION DE COLONIAS Y CRECIMIENTO EN AGAR | 56 |
| V.7. OBTENCION DE CLONAS POR LA TECNICA MAS EFICAZ..... | 60 |
| V.8. COMPORTAMIENTO CLONAL <u>IN VIVO</u> | 62 |
| VI. DISCUSION | 68 |
| VI. CONCLUSIONES | 77 |
| BIBLIOGRAFIA | 78 |
| APENDICE A | |
| APENDICE B | |
| GLOSARIO | |

I. ANTECEDENTES

I.1 IMPORTANCIA EN SALUD PUBLICA DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS

La enfermedad de Chagas es una de las principales *endemias* del Continente Americano, por lo que se encuentra considerada entre las parasitosis más importantes por la Organización Mundial de la Salud (OMS). Su distribución geográfica comprende desde el sur de los Estados Unidos de Norteamérica, hasta la provincia de Río Negro, en el sur de Argentina²⁴. Estimaciones efectuadas en 1992 por la Organización Panamericana de la Salud (OPS), basadas en los estudios seroepidemiológicos realizados en América Latina, indican una prevalencia global de 16-18 millones de individuos infectados con *T. cruzi*, y al menos 90 millones de personas se encuentran en riesgo de contraer la infección²⁴ (Fig. 1).



Fig. 1. Distribución geográfica de la enfermedad de Chagas en América.

Con base en los criterios de magnitud de la transmisión, calidad y cantidad de información epidemiológica disponible, así como la existencia o ausencia de programas de control de la Enfermedad de Chagas, la OMS agrupa a los países en cuatro categorías; México pertenece al grupo de países con una elevada prevalencia, determinada mediante el reporte de reacciones serológicas y casos de individuos con **cardiopatías** y **visceromegalias** causadas por la infección de *T. cruzi*²¹.

Los resultados de la Encuesta Seroepidemiológica Nacional realizada en 1987, con la prueba de Hemaglutinación indirecta, empleando como título de corte 1:327, señalan con 1.2% el porcentaje de casos de infección. Otros estudios efectuados en áreas rurales y zonas que presentan condiciones socioeconómicas y ecológicas adecuadas para la presencia de los transmisores y huéspedes infectados con *T. cruzi*, demuestran una seroprevalencia que va del 10 al 85%, predominando algunas comunidades de los estados de Nayarit, Jalisco, Nuevo León, Oaxaca, Guerrero, Veracruz, Querétaro y Zacatecas. Los resultados sugieren que la Enfermedad Chagásica se distribuye en todo el país, sólo que situada en bolsones ubicados en zonas rurales de prácticamente todos los estados³⁴ (Fig. 2).

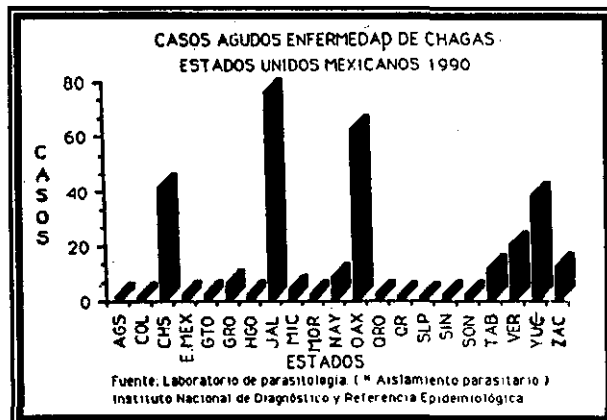


Fig. 2. Casos agudos de Enfermedad reportados hasta 1990.
(Tomado de Velasco, 1991)

I.2 EL AGENTE ETIOLOGICO

Trypanosoma cruzi es un protozoo flagelado, polimórfico y versátil. Presenta por lo menos tres formas bien definidas en su ciclo biológico: amastigote, epimastigote y tripomastigote. Puede encontrarse tanto en cualquier mamífero, como en insectos reduvidos hematófagos denominados **triatóminos**; puede adoptar una forma intracelular y otras extracelulares, y se adapta a una temperatura que incluye un rango de 21°C a 37°C, dependiendo del microambiente donde se encuentre.

La clasificación taxonómica de *T. cruzi* según Levine, 1980 es la siguiente:

Phylum Protozoa

Subphylum **Sarcomastigophora**

Superclase **Mastigophora**

Clase **Zoomastigophora**

Orden kinetoplastida

Suborden **Trypanosomatinae**

Familia **Trypanosomatinae**

Género *Trypanosoma*

Especie *T. cruzi*

I.2.1 FASES EN SU CICLO DE VIDA

El amastigote es intracelular, de forma esférica u ovoide, mide de 1.5 a 4 µm de diámetro mayor, presenta un núcleo, un cinetoplasto y un axonema; se reproduce por fisión binaria formando cúmulos denominados nidos de amastigotes (Fig. 4). El promastigote es extracelular y de aspecto fusiforme, en esta fase el

cinetoplasto se encuentra en posición anterior y presenta un flagelo libre sin membrana ondulante y mide aproximadamente 20 μm de largo (Fig. 5).

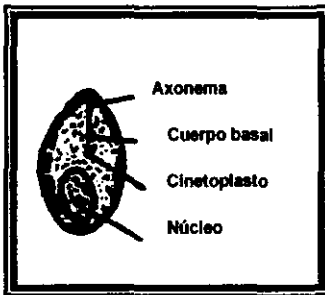


Fig. 4. amastigote

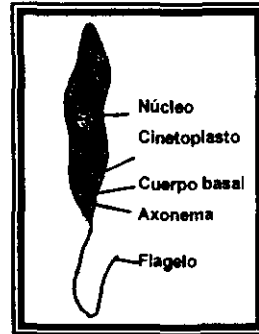


Fig. 5. promastigote

El epimastigote al igual que el promastigote es fusiforme y extracelular, el cinetoplasto está colocado próximo al núcleo, cerca de aquél sale un flagelo que da lugar a una membrana ondulante pequeña, mide aproximadamente 20 μm de largo. Esta es una fase de reproducción que se encuentra en el intestino medio del *transmisor* y en medios de cultivo (Fig. 6).

El tripomastigote es la fase infectante para cualquier *huésped*, es fusiforme y extracelular, el cinetoplasto se encuentra en la región posterior, cerca de éste se origina un flagelo que recorre todo el cuerpo formando una membrana ondulante que sale libre por el extremo anterior; mide aproximadamente 20 μm de longitud. De acuerdo al *huésped* que éste parasita se distinguen dos tipos: "el tripomastigote sanguíneo", que se encuentra en la sangre del *huésped* vertebrado, y el "tripomastigote metacíclico" en la parte posterior del intestino del *triatómino*² (Fig. 7).

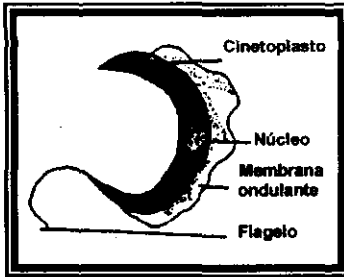


Fig. 6. epimastigote

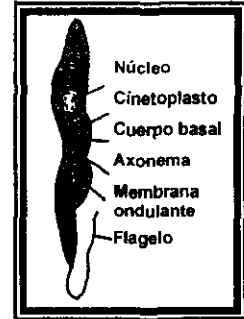


Fig. 7. tripomastigote

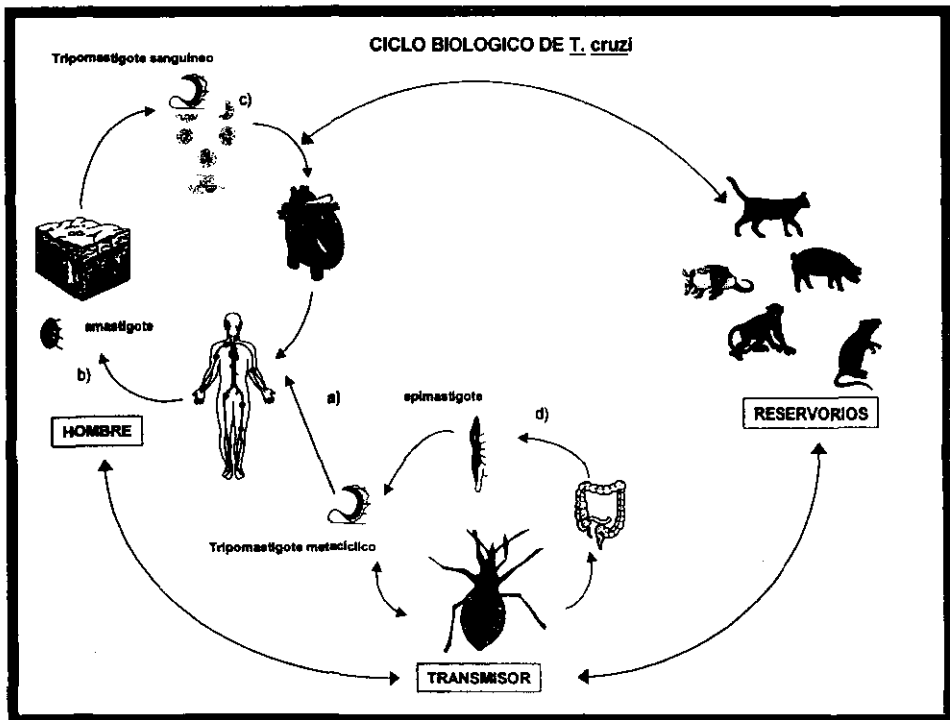
I.2.2 CICLO BIOLÓGICO

Cuando los *triatóminos* se alimentan, frecuentemente defecan sobre la piel del *huésped*. Si el insecto se encuentra infectado con *T. cruzi* sus heces contienen tripomastigotes metacíclicos, los cuales penetran a través del orificio de la picadura por las excoriaciones producidas con el rascado de la piel, o a través de las mucosas que son frotadas con los dedos contaminados con heces. El momento y tiempo de defecación durante el contacto con el *huésped* son de crucial importancia en la transmisión dado que a mayor volumen de deyecciones y contacto de éstos con la piel, mayor probabilidad de infección.

Una vez que el parásito infecta a su *huésped*, (a) se introduce en las células que se encuentran adyacentes al sitio de la picadura, pierde rápidamente la membrana ondulante con el flagelo y se transforma hasta la fase de amastigote en el citoplasma de la célula (b). En éste momento se multiplica en repetidas ocasiones hasta que se transforman de nuevo a tripomastigotes, los cuales lisan la célula *huésped* y entonces salen para infectar otras células adyacentes. En los espacios intersticiales se pueden observar formas intermedias, (promastigotes y epimastigotes) que pueden completar su metamorfosis y llegar al torrente sanguíneo transformados a tripomastigotes (c).

Cuando un triatómino no infectado se alimenta de la sangre del huésped infectado, lleva consigo tripomastigotes sanguíneos, los cuales al dirigirse al intestino medio del insecto, se transforman en epimastigotes, y se multiplican por fisión binaria (d); éstos llegan al recto y se convierten en tripomastigotes metacíclicos, los cuales representan la forma infectante de un nuevo huésped vertebrado (d-a) ^{21, 34}.

El esquema del ciclo biológico de *T. cruzi* es el siguiente:



I.3. LA ENFERMEDAD DE CHAGAS

I.3.1. MECANISMOS DE TRANSMISION E INFECCION DE *T. CRUZI*

Esta parasitosis se origina por múltiples factores, los cuales involucran diferentes mecanismos de transmisión e infección. Es importante mencionar que éstos dependen directa o indirectamente de las condiciones nutricionales, inmunológicas y genéticas del *huésped*; que resultan en una manifestación de resistencia o susceptibilidad. Otro factor del cual depende esta infección, le constituye la *virulencia* de la población de *T. cruzi*.

El parásito puede ser transmitido al hombre por vía oral, trasplacentaria, transfusional, conducto de la leche materna, transplante de órganos, inoculación accidental en el laboratorio, y en forma natural, mediante las deyecciones de chinches denominadas *triatóminos*; insectos hematófagos que pertenecen a la Familia Reduvidae y Subfamilia Triatominae (Fig. 8). El hábitat primario de los *triatóminos* se encuentra principalmente en madrigueras y nidos de animales homeotermos silvestres, algunos tienen preferencia por un ambiente intradomiciliario ²¹.

Los *triatóminos* miden de 2 a 5 cm. de longitud, su cuerpo es aplanado en sentido dorsoventral, de color negro o pardo, su cabeza es larga y cónica, por detrás de los ojos se localizan los ocelos y por delante de éstos un par de antenas muy delgadas. Poseen tres pares de patas que nacen del tórax y un par de alas; su probócidе es larga y se encuentra doblada en ángulo agudo hacia la porción ventral del abdomen que también es alargada y utiliza para picar al huésped. Generalmente poseen colores brillantes que van del rojo al amarillo según la especie, alternando con colores oscuros ² (Fig. 8).

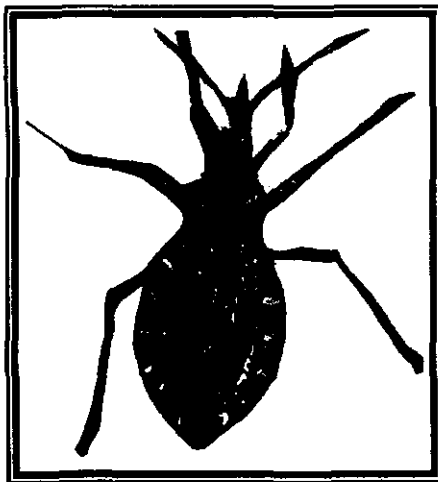


Fig. 8. Triatómino

T. cruzi posee un amplio rango de huéspedes vertebrados que actúan como **reservorios**; entendiéndose por éste un organismo capaz de albergar formas infectantes del **parásito**; entre ellos se encuentran varios animales mamíferos silvestres, así como algunos animales domésticos, donde se ha observado una infección natural o experimental con el parásito. Puede infectar al ratón, hámster, rata, conejo, conejillo de India, perro, gato, cabra, vaca, cerdo, etc., aunque los **reservorios** naturales más frecuentemente encontrados son el flacuache, armadillo, ratones de campo, mono, etc.

En general, los únicos animales que no son **reservorios** de *T. cruzi* son las aves y los reptiles. Se ha demostrado la presencia de una sustancia en el suero del pollo que lisa al epimastigote, pero no a los tripomastigotes sanguíneos; esto no ha sido totalmente clarificado ⁵.

1.3.2. MECANISMOS DE PATOGENICIDAD DE T. CRUZI

Los mecanismos de patogenidad que han sido propuestos en la Enfermedad de Chagas consisten en:

a) Lesión directa de las células parasitadas debida a la multiplicación intracelular del parásito. T. cruzi invade cualquier tipo de células, pero las más frecuentemente invadidas son las que forman parte del músculo cardíaco, liso y esquelético; en algunos casos, también se ha demostrado su presencia en células del sistema nervioso central, piel, gónadas, mucosa intestinal, médula ósea y placenta.

En pacientes que se encuentran en fase aguda y son sometidos a tratamiento inmunosupresor, se ha demostrado que la penetración y proliferación del **parásito** se incrementa notablemente, lo cual permite inferir que en la fase aguda de la enfermedad los daños tisulares se deben a un efecto **citopático** de éste.

b) Lesión producida por toxinas liberadas por el parásito. Se propuso la hipótesis de la existencia de una toxina chagásica para explicar los fenómenos de **miocitólisis** que acompañan a la ruptura del seudoquiste; sin embargo, estudios posteriores demostraron su ausencia como mecanismo de daño.

c) Alteraciones del Sistema Nervioso Autónomo. Se ha sugerido que la enfermedad podría ser el resultado de una denervación y destrucción de neuronas y fibras nerviosas de manera difusa en distintas partes del organismo. Esta hipótesis sustentada mediante amplios estudios experimentales postula que la causa de daño de células no parasitadas sería la existencia de una neurotoxina que se hallaría dentro de las formas de amastigote como endotoxina o enzima, capaces de dañar cualquier tipo de célula, pero en especial las nerviosas.

Esto explicaría el hallazgo de *megavisceras* y *cardiopatía* tanto en humanos, como en modelos experimentales que surgen al ocurrir una denervación en éstos órganos y por consiguiente falta de contracción muscular, *estasis sanguínea* y fenómenos *isquémicos* inmunes y autoinmunes.

d) **Lesión inducida por la respuesta autoinmune del huésped.** Se postuló como un mecanismo alérgico en la *patogénesis* de la *miocardiopatía chagásica crónica*; la reacción alérgica está dirigida a células del huésped que presentan antígenos del *parásito*.

La infección con *T. cruzi* en el hombre y bajo condiciones experimentales en animales induce la respuesta inmune humoral y celular ¹. Los anticuerpos contra el parásito, son la expresión de la respuesta humoral específica que aparecen siempre a las pocas semanas de la infección y se mantienen durante toda la vida aún en individuos asintomáticos; experimentalmente se ha demostrado que la participación de anticuerpos IgG1 e IgG3 dirigidos contra un antígeno de *T. cruzi*, se incrementan en el curso de la infección generando dos poblaciones de anticuerpos una monorreactiva y otra polirreactiva.

Por otra parte, la participación de la respuesta inmune celular ha sido estudiada describiendo que los linfocitos T aislados de ratones infectados crónicamente, lisan células musculares y neuronas en ausencia del antígeno del *parásito*. En otros estudios al respecto, se ha descrito que las células mononucleares esplénicas dañan a los *cardiocytes* murinos en presencia de suero de ratón con infección crónica ²¹.

I.3.3. MANIFESTACIONES CLINICAS DE LA ENFERMEDAD

Clínicamente, la enfermedad se caracteriza por tres fases: 1) aguda, 2) indeterminada, y 3) crónica (Fig. 9).

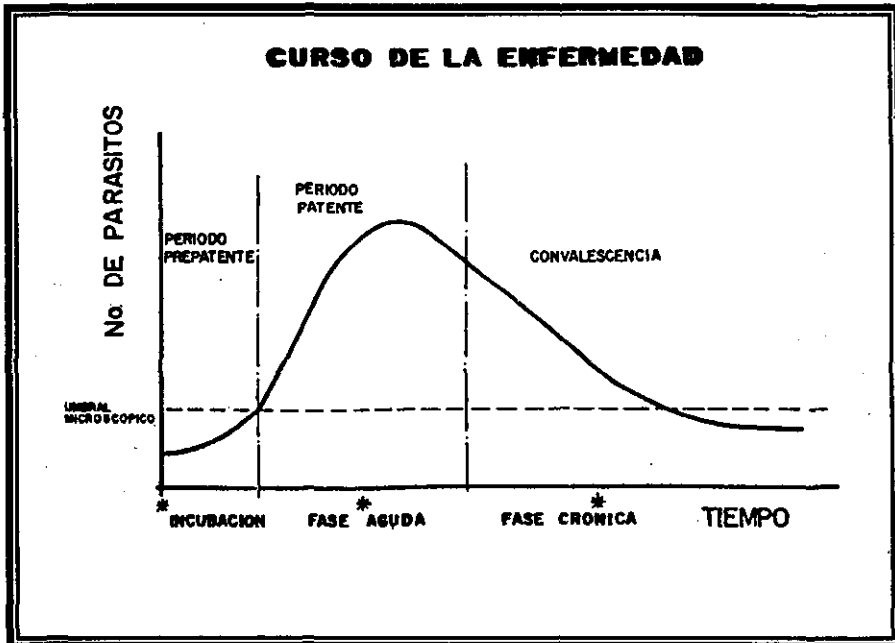


Fig. 9. Fases de la Enfermedad de Chagas

1) **Fase aguda.** Se presenta posteriormente a un periodo de incubación variable que es de 4 a 10 días, dependiendo de la edad del individuo, sexo, número de exposiciones, constitución genética y cantidad de inóculo. Se presenta fiebre que oscila entre 38°C y 40°C en el 98% de los casos con sintomatología ⁵. Asimismo, puede presentarse un patrón de comportamiento irregular acompañado de *cefalea*, vómito, diarrea, signos bronquiales, *linfadenitis* local o franca *poliadenopatía*, *astenia*, *mialgias*, *hiporexia*, *artralgias*, *miocarditis* con o sin parasitemia y *hepatoesplenomegalia*. Adicionalmente, si el sitio de entrada del parásito ocurre por conjuntiva, se produce el *Signo de Romaña*, que puede

definirse como la aparición de un edema eritematoso, violáceo indurado e indoloro que permanece durante 2 a 4 semanas.

La mayor parte de los casos en esta fase son sintomáticos en niños menores de dos años, siendo la **meningoencefalitis** una de las complicaciones más severas la cual se presenta con una mortalidad alta ³⁴. La duración de la fase aguda es de 2 a 4 meses; y al parecer, está relacionada con la presencia de formas circulantes del parásito en sangre así como la división de éste dentro de las células miocárdicas, macrófagos, fibroblastos y células del Sistema Nervioso Autónomo. El cuadro agudo puede remitir espontáneamente.

2) Fase indeterminada. Se verifica en la mayoría de los casos de 30 a 90 días posteriores a su instalación, en esta fase desaparece la sintomatología; sin embargo, la serología es positiva y con estudios ecocardio y electrocardiográficos es posible demostrar alteraciones cardíacas. En algunos casos empleando xenodiagnóstico y/o hemocultivo, se puede identificar al parásito.

Posterior a esta etapa se pueden llegar a observar de nuevo una diversidad de manifestaciones clínicas; alrededor del 30 % de los infectados manifiestan sintomatología por daño cardíaco, en el que se presenta **disnea** de esfuerzo, palpitaciones, dolor precordial e incluso insuficiencia cardíaca. En otros individuos se presenta **cardiomegalia** o **tromboembolismo**. Los **megavisceras** aparecen sólo en el 10 %, y la muerte repentina ocurre en el 60-70% de los pacientes infectados, la cual generalmente está asociada a daños del corazón por denervación.

3) **La fase crónica.** Esta fase manifiesta en el 30% de las personas infectadas en un lapso de 10 a 30 años después del contacto inicial con el agente causal. En esta fase se desarrolla la **Cardiopatía Chagásica Crónica**, considerada como la forma clínica más trascendental de la Enfermedad de Chagas que puede avanzar insidiosamente hacia insuficiencia cardiaca y en las áreas endémicas hasta la muerte súbita ²¹.

Otras formas clínicas que se presentan durante la infección, son las **visceromegalias** como **megaesófago** y **megacolon**; frecuentes en algunas regiones del Brasil y regiones endémicas de México tales como Chiapas, Oaxaca, Guerrero y Tabasco. Los órganos comúnmente afectados pueden ser duodeno, estómago, intestino delgado, hígado, vías biliares extrahepáticas, páncreas, bronquios, pulmón, y tracto urinario, además de la posibilidad de llegar a generar alteraciones secretoras a nivel de glándulas salivales y sudoríparas ³⁴.

1.3.4. VARIABILIDAD CLINICA

La infección con T. cruzi no necesariamente cursa con manifestaciones clínicas generalizadas en sus tres fases; más aún, en una fase existente pueden presentarse síntomas de otra o ausencia de manifestaciones de ésta. Es una de las particularidades de la infección ²⁵, la ausencia de manifestaciones clínicas de la enfermedad en las fases indeterminada y crónica se ha reportado en aproximadamente 70% de los casos; lo que resulta en una subestimación de la prevalencia e incidencia de la Enfermedad de Chagas.

La variabilidad clínica depende básicamente de la interrelación **huésped-parásito** y la respuesta inmune tiene un papel preponderante en el control de la infección y el balance que conduce a cronicidad. Por un lado, la infección con T. cruzi induce en el **huésped** mamífero una eficiente respuesta de defensa

especifica que depende del estado nutricional e inmunológico de éste; mientras que por otro lado, el **parásito** contribuye con factores propios relacionados con características fenotípicas y genotípicas.

No todos los individuos llegan a morir por causa de la infección; en algunos casos se ha reportado inmunosupresión en fase aguda, pero en la mayoría no es así. Existe una fase aguda asociada con parasitemia que en los sobrevivientes es paulatinamente controlada cuando emerge la respuesta inmune; luego se establece una infección crónica, donde es difícil la detección de parásitos en circulación, aunque nunca son totalmente eliminados del organismo. El **huésped** desarrolla así una inmunidad concomitante al **parásito**; es decir, que es capaz de resistir la reinfección pero no de eliminar totalmente a la nueva ni a la antigua población de T. cruzi.

I.4. HETEROGENEIDAD BIOLÓGICA DE T. cruzi.

Las poblaciones de T. cruzi reciben diferentes denominaciones dependiendo de las condiciones en que se hayan manejado a partir de su obtención: **a) aislado, b) cepa, c) stock, y d) clona**. Todas ellas con diferencias significativas.

- a) Un **aislado** es una población de organismos obtenida a partir de un huésped, ya sea el vertebrado o el transmisor; la cual es reproducida en su totalidad en un modelo experimental *in vitro* o *in vivo*.
- b) **Cepa** es la denominación utilizada cuando el conjunto de organismos obtenidos posee una ascendencia conocida, es decir que posee una combinación de características biológicas y/o genéticas bien definidas experimentalmente³¹; lo que no ocurre en el caso de un **stock**.
- c) El **stock** es una población la cual aún cuando se ha mantenido experimentalmente por largos periodos no se encuentra totalmente bien definida su caracterización o bien se conoce parcialmente.
- d) Una **clona** es una población proveniente de una sola célula; esta posee la misma constitución genética que la primera y sus características son transferibles a su descendencia. Excepto cuando ocurre mutación entre ellas.

Estas denominaciones permiten simultáneamente especificar el origen y conocimiento actual de la población; sin embargo estas por más específicas que puedan resultar, excluyen una característica determinante para la especie T. cruzi: **heterogeneidad biológica interpoblacional**. Es un hecho que las poblaciones T. cruzi pueden presentar variabilidad en sus características tanto genotípicas como fenotípicas con respecto a otras diferentes; principalmente manifestadas por la **infectividad, virulencia**, morfología, **tropismo** tisular, perfiles isoenzimáticos y constitución antigénica correspondientes^{1, 7, 19, 23, 35}.

Adicionalmente, dependiendo de la población en estudio incluso puede manifestarse **intrapoblacionalmente** esta característica de **heterogeneidad biológica**²⁵; específicamente existen reportados algunos artículos que demuestran lo anteriormente expuesto bajo diferentes condiciones, a continuación se mencionan algunos ejemplos:

La cepa CL ha sido utilizada ampliamente en varios estudios, se encuentra caracterizada como miotrópica y altamente infectiva y constituye una población heterogénea de parásitos; el estudio de varias clonas obtenidas a partir de esta cepa demostró claramente un comportamiento heterogéneo intrapoblacional¹⁹. El evento también se observó en otro experimento realizado con clonas obtenidas a partir de un perro infectado con la cepa CA-1 de *T. S. Cruzi*²¹.

Un estudio realizado con dos clonas obtenidas del stock SylvioX10 permitió demostrar heterogeneidad intrapoblacional mediante diferencias de infectividad. La clona SylvioX10/4 mostró un comportamiento diferente a la clona SylvioX10/7 cuando se indujo la infección en ratón. Por un lado SylvioX10/4 produjo infección crónica y SylvioX10/7 infección letal aguda bajo idénticas condiciones experimentales²⁵.

Análogamente, un experimento realizado con once clonas obtenidas con parásitos provenientes de un huésped en fase crónica mediante la infección a *Triatoma infestans* demostró mediante un análisis de **esquizodemos** que solamente dos fueron infectantes, con lo cual confirma que ocurre mezcla de clonas en una infección humana¹¹.

1.4.1. CARACTERIZACION DE T. CRUZI

El conocimiento de **heterogeneidad biológica intrapoblacional e interpoblacionalmente** para T. cruzi, ha traído consigo de alguna manera la necesidad de una caracterización del parásito más específica; misma que a su vez señale perfectamente las diferencias entre una población de otra. Así para su establecimiento inicialmente se utilizaron una serie de ensayos biológicos, mismos que actualmente forman parte integral de la **caracterización fenotípica** a la cual paulatinamente con el desarrollo de la biología molecular se introdujeron técnicas de investigación para tal efecto; es decir, para su **caracterización genotípica**.

CARACTERIZACION FENOTIPICA. Se realiza mediante **biodemos**, los cuales se definen como estudios de poblaciones biológicas y su correlación patógena en modelos experimentales, donde el modelo murino es el más ampliamente utilizado. El **biodemo** establece tres tipos de comportamiento de acuerdo a criterios de evolución de la enfermedad.

En el **biodemo I** los parásitos presentan una multiplicación rápida, parasitemia alta entre 7 y 12 días postinfección, predominio de formas delgadas y macrofagotropismo. En el **biodemo II** los parásitos presentan una multiplicación media de pico de parasitemia entre los 12 y 20 días, con predominio de formas gruesas y miotropismo especialmente a tejido cardiaco. El **biodemo III** incluye parásitos que presentan una multiplicación lenta, con picos de parasitemia entre 20 y 30 días, predominio de formas gruesas y miotropismo; especialmente a músculo esquelético. Los reportes de los estudios de las cepas obtenidas en diferentes regiones del país muestran que de acuerdo a estos criterios la mayoría de éstas pertenecen al **biodemo III** ²¹.

El estudio de la evolución de la enfermedad o curso de la infección se establece mediante la determinación del comportamiento biológico de la población de T. cruzi, mismo que se realiza mediante ensayos *in vivo* e *in vitro*.

ENSAYOS *IN VIVO*. Los ensayos *in vivo* para la caracterización fenotípica del parásito consisten básicamente en: a) **Obtención de la curva de parasitemia** (con la que se establecen correlacionadamente parámetros importantes tales como el pico de parasitemia y el porcentaje de mortalidad acumulada durante la infección) b) **Observación de la morfología de los tripomastigotes sanguíneos**, c) **Determinación del histotropismo de la población en estudio**, d) **Determinación de la histopatología de la misma**.

a) **Obtención de la curva de parasitemia.** La curva de parasitemia es específica para cada población, lo cual indica que las características de **infectividad** y **virulencia** son inherentes a la población de T. cruzi en estudio⁷ (Fig. 10). Sin embargo, se ha demostrado que para la determinación de ésta existen también factores independientes al **parásito**; tales como la cantidad, frecuencia del inóculo⁶, así como la susceptibilidad genética del **huésped** (Fig. 11). Es por ello que se ha propuesto esta estrategia para relacionar el comportamiento patógeno del **parásito** con su procedencia geográfica.

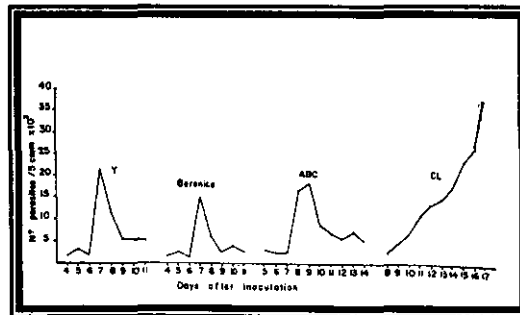


Fig. 10. Curvas de parasitemia obtenidas para cuatro cepas diferentes de T. cruzi en un modelo murino (Tomado de Melo y Brener, 1978)

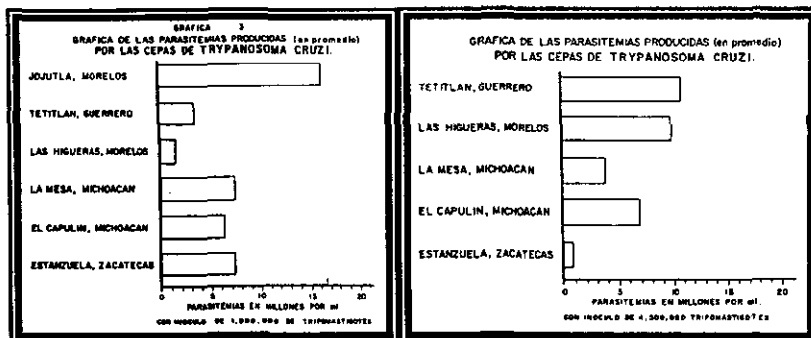


Fig. 11. Variación de la parasitemia ocurrida por cinco cepas diferentes de *T. cruzi* con diferentes inóculos para cinco cepas diferentes en un modelo murino. (Tomado de Tay y cols., 1973)

Adicionalmente se ha observado también que la curva de parasitemia varía en función del tiempo de mantenimiento *in vivo* de la población de *T. cruzi* ²⁸

(Fig. 12)

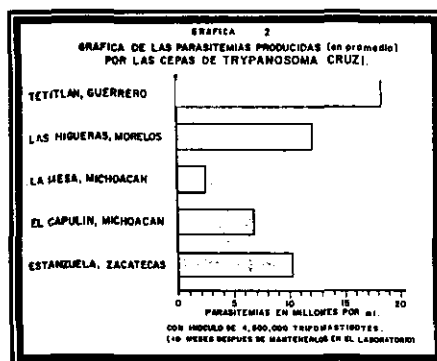


Fig. 12 Variación de la parasitemia producida por cinco cepas diferentes de *T. cruzi* después de mantenerlas *in vivo* durante diez meses. (Tomado de Tay y cols., 1973)

El curso de la infección se monitorea paulatinamente mediante la cuantificación de parásitos circulantes expresados por mililitro de sangre. Al cabo de un periodo preestablecido de infección experimental se registra el porcentaje de mortalidad ocasionada por una población de *T. cruzi* en un número limitado de ratones inoculados y se analiza el día donde se encuentra el máximo de parásitos circulantes, llamado "pico de parasitemia". También puede determinarse la dosis

letal 50 (DL_{50}) cuando se trabaja con un lote de 100 ratones, lo cual no es usual ni recomendable, ya que los resultados no difieren significativamente empleando un lote menor.

b) Observación de la morfología de tripomastigotes sanguíneos. Es poco funcional actualmente, ya que no es una característica poblacional determinante que permita discernir entre una población y otra. Existen diferencias en la morfología de los tripomastigotes sanguíneos incluso intrapoblacionalmente; por lo que se ha utilizado para describir cualitativamente la generalidad de una población.

Para explicar la heterogeneidad morfológica intrapoblacional, Romaña y otros autores, han propuesto que en el vertebrado parasitado ocurre de una manera simultánea un ciclo vital de progresión fusiforme que termina en tripomastigote delgado, y otro de progresión orbicular que origina tripomastigotes anchos. Se explica que ambas formas son simplemente el resultado del polimorfismo del género *Trypanosoma*, pero que difieren en su capacidad de penetrar a las células del vertebrado en la resistencia a la inmunidad del *huésped*, y especialmente en la eficiencia para infectar al insecto *transmisor*.

Así, las formas delgadas penetran con rapidez en las células del *huésped*, son fácilmente destruidas por el sistema inmunitario del huésped, y es difícil que parasiten un invertebrado cuando éste las ingiere; sucede todo lo contrario con los tripomastigotes anchos, que al parecer son los únicos capaces de infectar a los *triatóminos*³⁴.

c) Determinación del histotropismo de la población. La existencia de cepas de *T. cruzi* con determinada afinidad o preferencia para la invasión y acumulación de parásitos en determinados órganos o tejidos para prevenir el reconocimiento por algún tipo de células, ha sido reportada por varios autores²⁰.

Algunas cepas sólo causan infecciones subclínicas, pero existen otras con diferente tropismo (Tabla 1); así por ejemplo, la **virulencia** será mayor en las cepas neurotrópicas y cardiotrópicas, que en las que poseen tropismo tisular³⁴.

| LOCALIDAD | FUENTE DE AISLAMIENTO | SUSTRATO | VISCEROTROPISMO PREFERENTE |
|-------------------------|--|-----------------|----------------------------|
| Tetlilán, Guerrero | <i>Triatoma phyllosoma mazzotti</i> | Heces | Cardiotrópica |
| Estanzuela, Zacatecas | <i>Triatoma phyllosoma intermedia</i> | Heces | Cardiotrópica |
| Las Higueras Morelos | <i>Triatoma phyllosoma pallidipennis</i> | Heces | Miotrópica |
| La Mesa, Michoacán | <i>Triatoma barberi</i> | Heces | Cardio y miotrópica |
| El Capulín, Michoacán | <i>Triatoma barberi</i> | Heces | Miotrópica |
| Jojutla, Morelos | Sangre humana | Cultivo | Miotrópica |
| Cocula, Jalisco | <i>Triatoma barberi</i> | Heces | Cardiotrópica |
| Santa Catarina, Jalisco | <i>Triatoma barberi</i> | Heces | Cardiotrópica |
| La Cruz, Jalisco | <i>Triatoma barberi</i> | Heces | Miotrópica |
| Zacoalco, Jalisco | <i>Triatoma barberi</i> | Heces | Miotrópica |
| Santa Catarina, Sinaloa | Sangre humana | Xenodiagnóstico | Cardiotrópica |
| La Cueva, Querétaro | <i>Triatoma barberi</i> | Xenodiagnóstico | Cardio y viscerotrópica |

Tabla 1. Fuente de aislamiento, sustrato e histotropismo de algunas cepas de *T. cruzi* (Tomado de tay y cols., 1980)

d) Determinación de la histopatología de la población. La histopatología puede definirse como el grado de severidad de las manifestaciones clínicas y lesiones a diferentes órganos debidas a la infección; depende directamente de la **virulencia** de la población que infecta al **huésped** y se ha demostrado que se manifiesta en diferente grado.

Bice y Zeledon compararon la infectividad y carga parasitaria de cinco cepas costarricenses miotrópicas de *T. cruzi* en ratones C3H; observaron que el grado de invasión varió para cada uno de los órganos revisados³. Del mismo modo, otro estudio realizado con ratones infectados con cuatro cepas diferentes demostró diferencias significativas en el grado de invasión a diferentes órganos¹⁹

(Fig. 13).

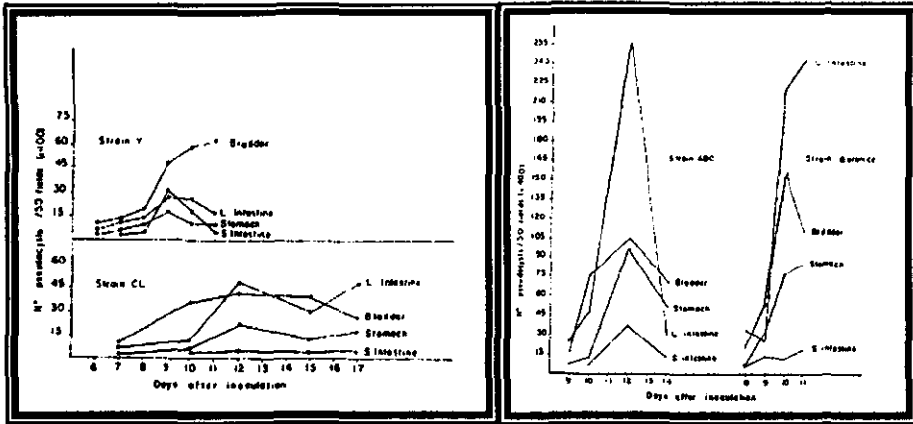


Fig. 13. Histopatología debida a la infección por cuatro cepas diferentes de *T. cruzi* (Tomado de Lima y cols., 1990)

ENSAYOS *IN VITRO*. Se realizan comúnmente mediante a) **Determinación de la cinética de crecimiento en medios de cultivo**, y b) **Infección de parásitos a líneas celulares**.

a) **Determinación de la cinética de crecimiento en medios de cultivo.** Al igual que la curva de parasitemia, la cinética de crecimiento es específica para cada población, por lo tanto característica determinante. *T. cruzi* es un **parásito** de accesible manejo y mantenimiento *in vitro*; crece rápidamente en la mayoría de medios utilizados para éste propósito. Los hay bifásicos y líquidos y para su enriquecimiento, generalmente se emplean componentes y sustancias séricas; usualmente también se consideran factores externos como la temperatura, humedad y agitación que permiten un ambiente natural favorecedor que imita la interrelación **huésped-parásito** ocurrida durante el ciclo biológico.

Se ha reportado que el medio LIT (Infusión de Triptosa-Hígado) se encuentra entre los mejores para obtener un crecimiento rápido y óptimo para la

determinación de la cinética de crecimiento en comparación con el obtenido con otros medios de cultivo ^{9, 12}.

b) Infección a líneas celulares. Se utilizan básicamente en este sentido para investigar la **virulencia** de la población en estudio, se registra a su vez la rapidez de infección, la reproducción intracelular, así como la lisis celular en términos de coeficiente de infección, porcentaje de células infectadas y relación de parásitos asociados a las células.

Existe un factor muy importante que se debe considerar respecto al mantenimiento *in vitro* de *T. cruzi*. Se ha demostrado experimentalmente que cuando se mantiene al parásito en el laboratorio por largos periodos de tiempo, la infectividad puede cambiar dando lugar a la atenuación ⁶. Este hecho se puede explicar mediante la teoría de que en este caso el parásito se encuentra en un medio enriquecido y favorecedor que le permite la reproducción. La ausencia de una respuesta inmune en el medio, ocasiona que no utilice mecanismos de evasión, por lo que su capacidad infectiva se pierde mediante la selección de las clonas más virulentas, las cuales se presume que son las más susceptibles a la adaptación *in vitro*.

Ejemplificando lo anterior, la literatura reporta un estudio donde se demuestra una marcada diferencia en **infectividad** y **virulencia** de una cepa que se mantuvo simultáneamente en un insecto transmisor y un cultivo axénico de tripomastigotes metacíclicos. El resultado muestra que la cepa mantenida en el redúvido conservó sus características de **infectividad** y **virulencia**; mientras que la cepa mantenida en medio de cultivo perdió parcialmente estas características³⁵.

Otro experimento en donde se utilizaron clonas obtenidas a partir de la cepa CA-1 mostró que existen diferencias significativas en la velocidad de crecimiento *in vitro* tanto en medios de cultivo como en líneas celulares a través

del tiempo de mantenimiento del parásito con respecto al comportamiento general de la cepa ²¹.

CARACTERIZACION GENOTIPICA. Las técnicas empleadas se aplican para el análisis de **a)** Acido desoxirribonucleico del cinetoplasto, (ADN_c) llamado **esquizodemo**, **b)** perfiles isoenzimáticos (**zimodemos**), **c)** proteínas (**peptinodemos**) y **d)** **patrones antigénicos** ³¹.

a) Esquizodemos. Las poblaciones de *T. cruzi* pueden ser agrupadas en subpoblaciones con similitud en patrones de restricción dados por endonucleasas en minicírculos de DNA del cinetoplasto del **parásito** ²³. Se reconoce que no ocurre recambio genético entre *T. cruzi*, por lo que el análisis de los patrones de restricción del ADN nuclear y los esquizodemos ofrecen una herramienta útil y confiable por su estabilidad para estudios taxonómicos y determinación de distancias evolutivas entre genes específicos. El ADN_c de *T. cruzi* esta compuesto de 95-98% de minicírculos y 2.5% de maxicírculos concatenados. Existen formando una red, aproximadamente 5×10^3 a 20×10^3 minicírculos de 0.9 a 2.5 kilobases (Kb) cada uno, y de 20 a 50 maxicírculos de 20-30 Kb.

Los maxicírculos, representan el ADN mitocondrial y poseen frecuencias nucleotídicas homogéneas, los minicírculos son heterogéneos y se desconoce su función. Recientemente se ha encontrado que al parecer, codifican para una molécula de ARN que sirve como guía en el proceso de edición de los genes codificados en maxicírculos. El análisis de las secuencias de minicírculos también ha sido empleada para identificar cepas de laboratorio y aislados de *T. cruzi*; agrupándolos además en cuatro regiones geográficas específicas, que permiten correlacionar el análisis genético con los estudios isoenzimáticos.

En México, Zavala y cols. realizaron un estudio con la finalidad de conocer la heterogeneidad a nivel molecular que presentan aislados mexicanos de diferentes zonas geográficas a través de los espaciadores no transcritos del ADN ribosomal y de los maxicírculos del ADN. Encontraron que con esta metodología, es posible agrupar aislados de diferentes áreas geográficas a través de los fragmentos de restricción de las endonucleasas Hind-I²¹.

b) Zimodemos. En éste caso se investiga si en las diferentes poblaciones del parásito se encuentran moléculas que realizan la misma función que una enzima que difieran estructuralmente y por consiguiente en peso molecular; al correr electroforéticamente (zimograma), una vez que se coloca el sustrato correspondiente para su revelado se observa un patrón de bandeo característico que permite discernir si las poblaciones son distintas entre sí.

c) Peptinodemos. Bajo el mismo principio de los zimodemos, en este caso se determina la presencia de proteínas comunes para determinar diferencias o similitudes entre poblaciones.

d) Patrones antigénicos. La diversidad en constitución antigénica ha sido demostrada para T. cruzi. De hecho, existe heterogeneidad antigénica en una población; los estudios para llevar a cabo esta tarea permiten determinar la existencia de antígenos específicos, ya sean de productos subcelulares o bien de glicoproteínas de superficie⁴. Usualmente se determinan por medio de **inmunolectroforesis**.

I.5. TEORIA CLONAL DE T. cruzi

Tibayrene, es uno de los investigadores que mayormente ha contribuido a proponer que T. cruzi se comporta de manera clonal. El análisis cromosómico muestra que las poblaciones del parásito no realizan meiosis; lo que nos lleva a inferir que la reproducción de éste es por fisión binaria, y aún cuando existen diferentes cariotipos en las cepas, existe estabilidad.

Clonalmente la información genética es constante. La pregunta que se sugiere por si misma ¿Porqué existen entonces en la naturaleza poblaciones de T. cruzi con diferentes características genotípicas?. Charles Darwin estableció que " Las poblaciones mutan por causas naturales a través de la evolución y que la información genética no varía por recambio genético entre las poblaciones".

Evolutivamente, T. cruzi debió haber sufrido mutaciones que le permitieron adaptarse a distintas condiciones ambientales; aquellas que no mutaban y por lo tanto no eran capaces de soportar tales cambios en el ambiente, desaparecían ocasionando la selección de las más adaptables, que actualmente existen en la naturaleza. Por otro lado, el hecho de que actualmente las poblaciones exhiban cierto grado de " homogeneidad " y características distintivas está relacionado posiblemente con factores selectivos del **huésped**, tales como variaciones en inmunidad racial, clima, flora, altura; así como la patogenicidad de las diferentes cepas y especies de los **transmisores** ²⁸.

Sin embargo, existe un punto importante adicional para T. cruzi; algunas poblaciones probablemente deben su heterogeneidad a pases naturales progresivos del **parásito** en diferentes huéspedes, que incluso pueden haber estado infectados con otra población diferente anteriormente ⁵.

I.5.1 IMPORTANCIA DE LAS POBLACIONES CLONADAS

Como se ha mencionado, la Enfermedad de Chagas tiene gran impacto en América Latina, y en caso especial en México. Dentro de nuestro país se realizan estudios cada vez más especializados a fin de obtener la mayor información que nos lleve a conocer ampliamente al **parásito**, así como la forma más eficaz para disminuir los índices de **mortalidad y morbilidad** de la enfermedad.

A lo largo del presente trabajo, se han expuesto los diferentes factores que muestran la naturaleza heterogénea de *T. cruzi*, lo que nos hace pensar en primera instancia en la conveniencia de trabajar con una población homogénea del **parásito** en estudios de mayor especificidad.

En este sentido, las clonas del **parásito** han demostrado estabilidad en diferentes campos: cinética de crecimiento y composición del DNA total del microorganismo, estudios para manifestación de **virulencia y patogenicidad** en animales de experimentación, así como en análisis de perfiles isoenzimáticos y de restricción por endonucleasas ⁴.

De esta manera, las clonas de *T. cruzi* representan material de elección para estudios de constitución genética y antigénica (actualmente se buscan vacunas con base en antígenos específicos); además constituyen el modelo poblacional ideal para la evaluación de fármacos anti- *T. cruzi*. Sin embargo la característica más importante que brinda el trabajo con clonas es la de asegurar que al no existir heterogeneidad intrapoblacional, los resultados sean reproducibles experimentalmente hablando ^{10, 19, 25, 36}.

II. OBJETIVOS

- Estandarizar una técnica de clonación de *T. cruzi* para aislados, stocks y cepas mexicanas.

- Obtener clonas de *T. cruzi* a partir de tres aislados mexicanos.

- Evaluar el comportamiento *in vivo* de las clonas obtenidas con respecto al aislado correspondiente y los demás en estudio.

III. HIPOTESIS

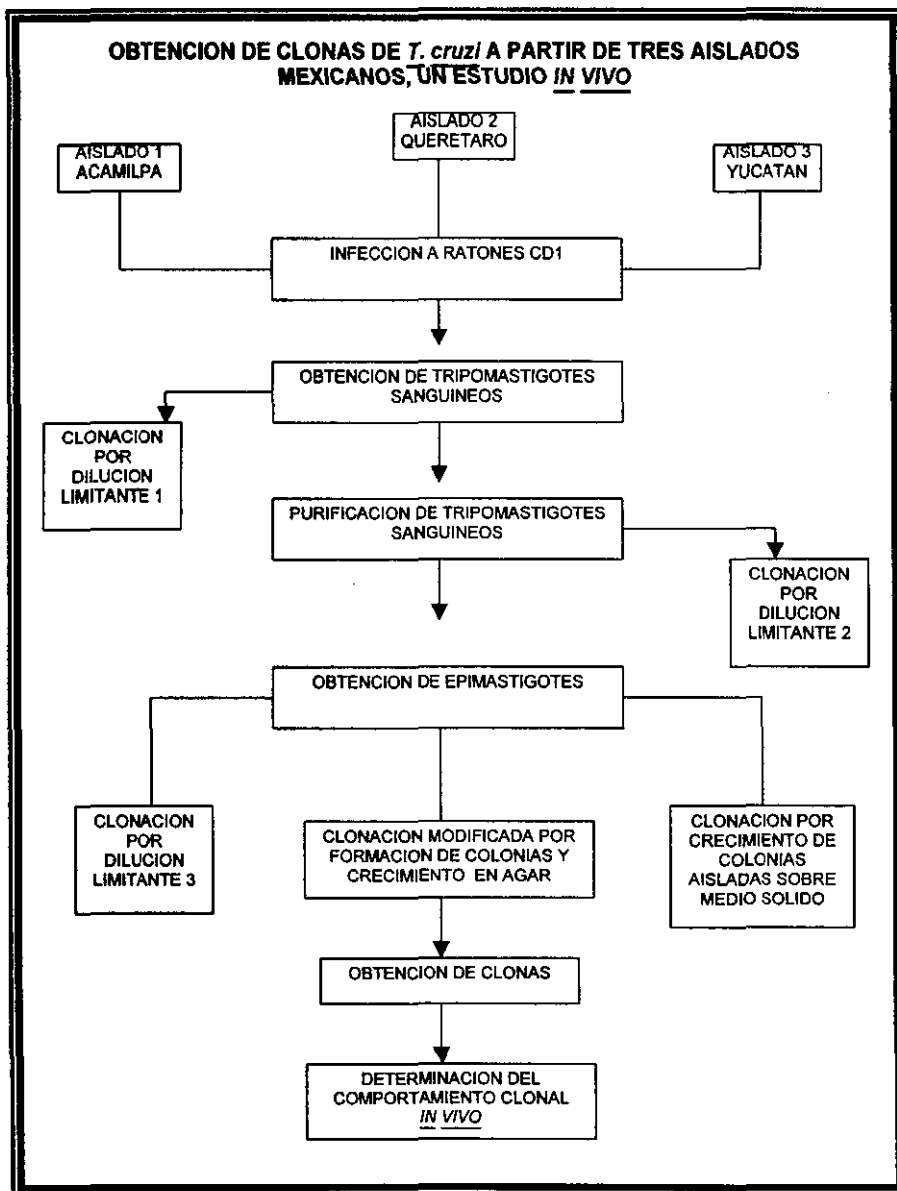
- La estandarización de una técnica de clonación para aislados mexicanos de *T. cruzi*, permitirá determinar la existencia de heterogeneidad intrapoblacional en éstos mediante el estudio del comportamiento biológico *in vivo* de las clonas obtenidas.

IV. MATERIAL Y METODOS

Para la realización del proyecto se llevaron a cabo las siguientes actividades generales:

- 1) Determinación del comportamiento *in vivo* de los aislados.
- 2) Obtención de tripomastigotes sanguíneos.
- 3) Técnica de clonación por dilución limitante a partir de tripomastigotes sanguíneos (DILUCION LIMITANTE 1).
- 4) Purificación de tripomastigotes sanguíneos.
- 5) Técnica de clonación por dilución limitante a partir de tripomastigotes sanguíneos purificados (DILUCION LIMITANTE 2).
- 6) Técnica de clonación por dilución limitante a partir de epimastigotes (DILUCION LIMITANTE 3).
- 7) Técnica de clonación por crecimiento de colonias aisladas sobre medio sólido.
- 8) Técnica modificada de clonación por formación de colonias y crecimiento en agar.
- 9) Obtención de clones por la técnica más eficaz.
- 10) Determinación clonal *in vivo*.

ESQUEMA DE TRABAJO DE LAS ACTIVIDADES REALIZADAS



IV.1. DETERMINACION DEL COMPORTAMIENTO *IN VIVO* DE LOS AISLADOS

- ORIGEN**

Se utilizaron tres diferentes aislados mexicanos en el estudio: Acamilpa, Querétaro y Yucatán; obtenidos de distintos *reservorios* y regiones del país, se eligieron con el fin de contar con poblaciones representativas. Los aislados se han mantenido experimentalmente en la fase de tripomastigote sanguíneo mediante pases progresivos a ratones que pertenecen a la cepa CD-1.

| Aislado | Lugar de origen | Fuente |
|-----------|---|---------------------|
| Acamilpa | Morelos, Edo. Méx. | canino hembra |
| Querétaro | Villa Corregidora (La Cueva), perteneciente al municipio de villa del pueblito, Qro., Edo. Méx. | Triatoma barberi |
| Yucatán | Yucatán, Edo. Méx. | cerdo |

Tabla 2. Lugar de origen y fuente de los aislados utilizados en el estudio

- MANTENIMIENTO**

Durante el desarrollo del estudio, los aislados se mantuvieron en la fase de tripomastigote sanguíneo mediante la infección a ratones CD-1 hembras de 6-8 semanas de edad. La dosis administrada fue 1×10^6 tripomastigotes por cada ratón en un volumen de inóculo no mayor a 0.4 mL.

- DETERMINACION DE LA CURVA DE PARASITEMIA**

La parasitemia en infecciones con *T. cruzi*, puede ser determinada por diferentes técnicas. En este caso, la cuantificación se realizó con hemocitómetro en la misma forma que las concentraciones celulares sanguíneas; sin embargo, éste método es aplicable solamente en parasitemias mayores a 1×10^6 organismos por cada mL de sangre. Es por ello, que basado en métodos reportados en la

literatura ¹³, se propuso el establecimiento de la estandarización de una técnica para la cuantificación de tripanosomas en parasitemias bajas que se presentan en los primeros días de la infección y que no pueden ser cuantificadas con hemocitómetro.

La cuantificación de parásitos con hemocitómetro se realiza obteniendo gotas de sangre a partir del ratón infectado, cortando la punta de la cola. Para concentraciones mayores a 1×10^8 organismos por cada mL. de sangre, las gotas se colocan sobre un portaobjeto y se toman $10 \mu\text{L}$ de sangre y $90 \mu\text{L}$ de solución salina de fosfatos pH 7.2 (PBS), homogeneizando hasta obtener una dilución 1:10. Enseguida se toma una alícuota de $10 \mu\text{L}$ y se coloca en un hemocitómetro para cuantificar la concentración de organismos existentes en la zona central de la cuadrícula; el resultado se calcula considerando el número de organismos y el factor de dilución correspondiente y se expresa como número de parásitos por cada mL. de sangre.

En el caso de infección temprana, se colocan 10 microlitros de sangre sobre un portaobjeto se coloca el cubreobjeto y se cuentan los organismos existentes en el área total para calcular el número de parásitos por cada mililitro de sangre. Los resultados obtenidos por cualquier técnica se grafican en función del tiempo (días postinfección).

- **INFECCION A RATONES CD-1**

El experimento se realizó por triplicado para cada *aislado*; se manejaron lotes de 10 ratones hembras CD-1 de 6-8 semanas de edad y se consideró para cada lote un ratón sin infección como control. La dosis utilizada fue de 1×10^6 tripomastigotes por cada ratón en un volumen de $200 \mu\text{L}$ de inóculo. El curso de la infección se siguió mediante el conteo de tripomastigotes sanguíneos cada tercer día durante 45 días postinfección.

IV.2. OBTENCION DE TRIPOMASTIGOTES SANGUINEOS

Se extrajeron diferentes volúmenes de sangre mediante punción cardíaca a partir de ratones CD-1 infectados con *T. cruzi* que se encontraban en la concentración máxima de parásitos circulantes.

IV.3 CLONACION POR DILUCION LIMITANTE A PARTIR DE TRIPOMASTIGOTES SANGUINEOS (DILUCION LIMITANTE 1)

Se utilizaron placas para cultivo de células y medio DMEMc (Dulbecco's Modified Eagle Medium suplementado con SFB (Suero Fetal Bovino) al 10% inactivado, aminoácidos no esenciales y antibiótico). El inóculo fue ajustado a 0.1 células/ pozo con una probabilidad de **clonación** del 95%. Se realizaron observaciones para cada pozo con el fin de verificar la existencia de un tripomastigote; posteriormente se incubaron las placas a 28°C en ausencia de humedad hasta observar crecimiento. La técnica se realizó con tripomastigotes sanguíneos recién extraídos.

IV.4. PURIFICACION DE TRIPOMASTIGOTES SANGUINEOS

Se ha observado que existe cierta interferencia por células sanguíneas para el crecimiento *in vitro* de *T. cruzi* cuando la fuente de aislamiento es a partir de sangre total. Por tal motivo, se realizaron dos técnicas de purificación y concentración para su evaluación 1) Cromatografía por columna de intercambio aniónico con DEAE-celulosa (dietilaminoetil-celulosa) y, 2) Gradiente de separación con Ficoll-Hypaque. Ambas técnicas se analizaron con el fin de obtener el mejor rendimiento en viabilidad y número de parásitos y fueron modificadas de las reportadas en la literatura para satisfacer algunas condiciones.

- **CROMATOGRAFIA DE COLUMNA POR INTERCAMBIO ANIONICO CON DEAE-CELULOSA (T.I. Mercado and K. Katusha)**

Con esta técnica los tripomastigotes sanguíneos son rápidamente separados mediante la elución de una muestra a través de una columna de intercambio aniónico con DEAE-celulosa como fase estacionaria. La separación en este caso depende fundamentalmente de las diferencias en la carga superficial de las células; sin embargo aún cuando la carga de *T. cruzi* difiere entre especies, es lo suficientemente menor a de las células sanguíneas como para lograr una óptima separación del **parásito**. El DEAE-celulosa adsorbe mayormente los componentes celulares con carga negativa de la sangre; mientras que los parásitos que poseen menor carga negativa son eluidos en un tiempo no mayor a 30 minutos ^{16, 17, 22}.

El estudio llevó implícito una separación previa de glóbulos rojos y plaquetas de la muestra mediante un gradiente de separación con Ficoll-Histopaque (400 X g, 15 min., 20°C); mientras que la separación de plaquetas y glóbulos blancos, se realizó mediante la columna de intercambio aniónico.

Los tripomastigotes fueron eluidos con PBS-albúmina pH 7.2, PSG (solución salina de fosfatos glucosada) pH 8 y solución de glucosa como fase móvil. Las alícuotas fueron tomadas con periodos iniciales de 5.0 minutos y finales de 2.0 minutos hasta la elución de los parásitos; después de éstos, se consideraron tomas de alícuotas con tiempos de 0.30 minutos hasta la desaparición de *T. cruzi*. Posteriormente el volumen eluido con tripomastigotes se sometió a centrifugación (2, 000 X g, 15 min., 20°C). Los parásitos obtenidos se lavaron varias veces con PBS-albúmina al 4% y se resuspendieron en 10 mL de medio de cultivo RPMIc para su incubación a 28°C en ausencia de humedad hasta observar crecimiento.

• **GRADIENTE DE SEPARACION DE TRIPOMASTIGOTES SANGUINEOS CON FICOLL-HYPAQUE (Dalia B. Budzko and F. Kierszenbaum)**

El gradiente de separación se basa fundamentalmente en la característica física de densidad. Las formas de tripomastigote de *T. cruzi* poseen una densidad menor a 1.075 g/mL y la sangre una mayor a 1.077 g/mL; por lo que los tripanosomas pueden separarse fácilmente de las demás células sanguíneas después de adicionar Ficoll-Hypaque (δ 1.077 g/mL) a la muestra heparinizada (5-10 u/mL) y centrifugar a 400x g durante 40 min. en rotor horizontal a 20°C ⁶.

Después del procedimiento mencionado, se distingue la formación de cuatro capas claramente. La capa que contiene los parásitos es donde se encuentran los linfocitos, la cual es separada y lavada inmediatamente para eliminar el exceso de sustancias que podrían resultar tóxicas para *T. cruzi* (Fig. 14).

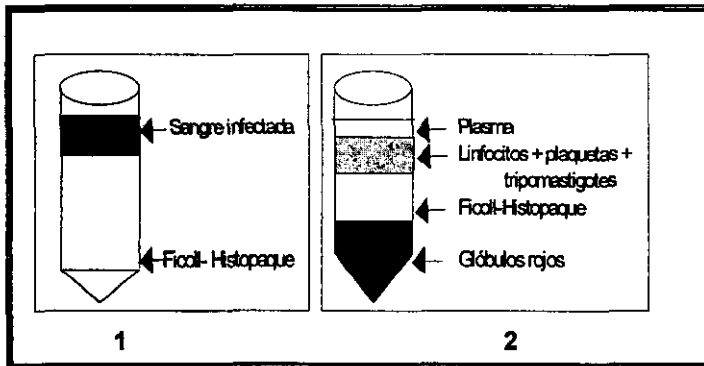


Fig. 14. Separación por gradiente de Ficoll-Hypaque

Cuando los parásitos obtenidos del gradiente son lavados utilizando sólo PBS, se ha observado, que el 90-100% de éstos son lisados inmediatamente después del segundo lavado; repercutiendo en la incorporación y viabilidad del **parásito**. *T. cruzi* es susceptible a elevadas concentraciones salinas; por lo que mantenerlo en un ambiente parecido a su fase infectante (rico en proteínas séricas) favorece la integridad de éste. Es por ello que para la realización del

estudio, los parásitos obtenidos se lavaron con solución de PBS suplementado con albúmina sérica bovina al 4% ¹⁵.

IV.5 CLONACION POR DILUCION LIMITANTE A PARTIR DE TRIPOMASTIGOTES SANGUINEOS PURIFICADOS (DILUCION LIMITANTE 2)

Se utilizaron placas para cultivo de células y medio DMEMc (Dulbecco's Modified Eagle Medium suplementado con SFB al 10% inactivado, aminoácidos no esenciales y antibiótico). El inóculo fue ajustado a 0.1 células/pozo con una probabilidad de **clonación** del 95%; se realizaron observaciones iniciales para cada pozo con el fin de verificar la existencia de un tripomastigote y posteriormente se incubaron las placas a 28°C en ausencia de humedad hasta observar crecimiento. Cabe mencionar que la técnica se realizó con tripomastigotes sanguíneos recién extraídos.

IV.6 CLONACION POR DILUCION LIMITANTE A PARTIR DE EPIMASTIGOTES (DILUCION LIMITANTE 3)

Se utilizaron placas para cultivo de células y LITc (medio de de cultivo de Infusión de Hígado-Triptosa suplementado con SFB al 10% inactivado, aminoácidos no esenciales y antibiótico). El inóculo fue ajustado a 0.1 células/pozo con una probabilidad de **clonación** del 95%; después se realizaron las observaciones iniciales para cada pozo con el fin de verificar la existencia de un epimastigote y se incubaron las placas a 28°C en ausencia de humedad hasta observar crecimiento. La técnica se realizó con cultivos frescos también.

OBTENCION DE EPIMASTIGOTES

- **MEDIO DE CULTIVO.**

El medio de cultivo de elección fue LITc; un medio líquido monofásico en el que el *parásito* ha demostrado una mayor adaptación para sus requerimientos nutricionales, que se refleja en un ambiente propicio y un periodo menor para alcanzar la fase de crecimiento con respecto a otros medios de cultivo ^{9, 12}.

- **MANTENIMIENTO Y ADAPTACION DE LOS AISLADOS *IN VITRO***

Se efectuaron pases sucesivos de los cultivos obtenidos de los tres aislados para su mantenimiento. Para este efecto, en el estudio se utilizaron tubos de ensaye de 15 mL de capacidad, con un inóculo de 1×10^6 epimastigotes por cada mL. para obtener un volumen final de 10 mL. de LITc por tubo. Posteriormente, se incubaron a 28°C en atmósfera de CO₂ hasta la observación de crecimiento masivo y se mantuvieron bajo este procedimiento durante el tiempo que se llevó a cabo el estudio.

- **CONFIRMACION DE LA CAPACIDAD INFECTANTE DE LOS AISLADOS *IN VITRO*.**

Simultáneamente al mantenimiento de cada uno de los aislados *in vitro*, se realizó un experimento para verificar la permanencia de la capacidad infectante para cada cultivo después de su manipulación. De esta manera, se inocularon por triplicado ratones hembras CD-1 de 6-8 semanas de edad y se manejaró respectivamente un ratón control sin inoculación por *aislado*. La dosis utilizada fue de 2×10^8 epimastigotes por cada ratón en un volumen no mayor a 0.3 mL.

A los 20 días postinfección se realizó la observación directa de una muestra sanguínea para cada uno de los ratones para la determinación de formas circulantes del **parásito**.

IV.7 CLONACION EN PLACA A PARTIR DE EPIMASTIGOTES

Las técnicas consideradas fueron: 1) **Clonación por crecimiento de colonias aisladas sobre medio sólido** y 2) **Clonación por formación de colonias y crecimiento en agar**.

- **CLONACION POR CRECIMIENTO Y AISLAMIENTO DE COLONIAS AISLADAS SOBRE MEDIO SOLIDO (S.S. Golberg and E.Chiari.)**

Esta técnica ha reportado el uso de dos tipos de medio para la preparación de las placas: agar sangre (67) y LITc-agar; en el estudio se utilizó LITc-agar con una concentración de agar al 1.5%. El procedimiento consiste en verter los parásitos ajustados a un tamaño de inóculo de 100 organismos previamente resuspendidos en un volumen de 0.1 mL. de LITc para su incorporación a una placa con 20 mL de LITc-agar.

Posteriormente, las placas son incubadas en forma invertida a 28°C por un periodo de 20 a 30 días hasta la aparición de colonias aisladas visibles; el crecimiento se verifica por la formación de colonias que se observan como manchas esféricas, regulares, lisas y traslúcidas, las cuales a medida que van creciendo adquieren color amarillo. Finalmente, las colonias son separadas del agar con palillos de dientes estériles e inoculadas en LITc, donde han mostrado alta viabilidad y adaptación ¹⁰.

En el estudio se realizaron otras diluciones diferentes a las reportadas en la literatura como inóculo; considerando así para cada cultivo la preparación de placas con 100, 250, 500 y 1000 epimastigotes, y una placa control de medio de cultivo.

- **CLONACION POR FORMACION DE COLONIAS Y CRECIMIENTO EN AGAR (Wittner y cols.)**

Es una modificación realizada a la técnica de Goldberg y Chiari reportada en 1990 que consiste básicamente en la formación de dos capas de agar en la placa, y no una como en la mencionada. Las dos capas la constituyen una base de LITc-agar al 1.4 % con una capa superior que se incorpora a la base previamente gelificada; la capa superior en este caso, es una suspensión constituida por LITc, la adición del inóculo deseado, y un volumen constante de LITc-agar al 1.4 % el cual se equilibra previamente a 45°C ^{11, 36}.

El resultado del homogeneizado de la capa superior proporciona una concentración final al 0.75% de agar, la cual totalmente gelificada permite la movilidad suficiente para el desarrollo de *T. cruzi*, y la retención necesaria para asegurar que no exista desplazamiento del **parásito**, y por lo tanto; que el desarrollo de la colonia resultante provenga a partir de una sola célula.

Un análisis previo del inóculo de epimastigotes para el establecimiento de un rendimiento óptimo de la clonación mostró cuatro diluciones finales de 500, 1000, 2500 y 5000 epimastigotes para cada placa como las más adecuadas; el experimento se llevó a cabo para cada aislado, con la consideración de una placa control respectivamente. Posteriormente las placas se incubaron de forma invertida a 28°C bajo condiciones de humedad y 5% de CO₂ hasta la observación de colonias aisladas visibles.

IV.8 OBTENCION DE CLONAS POR LA TECNICA DE CLONACION MAS EFICAZ

- **AISLAMIENTO DE CLONAS Y MANTENIMIENTO**

Una vez obtenidas las colonias, se procedió al reconocimiento de éstas, mediante las observaciones macroscópicas (forma, color, tamaño, y número) y un análisis microscópico. Las colonias se separaron del agar mediante la extracción con palillos de dientes estériles y fueron colocadas en botellas de cultivo de 25 cm² de área con 5 mL de LITc para su incubación a 28°C en atmósfera de 5% de CO₂ hasta observar desarrollo.

- **ADAPTACION CLONAL *IN VITRO***

Del total de las clonas obtenidas, se eligieron al azar cinco para cada *aislado* y se mantuvieron en fase de crecimiento en botellas de cultivo de 25 cm² de área con 5 mL de LITc bajo condiciones de humedad a 28°C; el experimento se llevó a cabo por triplicado para cada *clona*, sin dejar de considerar un control de medio de cultivo. La cuantificación de epimastigotes se registró diariamente hasta el decremento de epimastigotes en el medio de cultivo y se realizaron los "pases" o reinoculaciones necesarias para el mantenimiento de los cultivos durante el desarrollo del estudio.

- **CRIOPRESERVACION DE CLONAS**

La selección de cinco clonas para los estudios del comportamiento biológico *in vivo*, hizo necesaria la implementación de una técnica de preservación y mantenimiento de las clonas restantes para estudios posteriores. La criopreservación satisfizo estas necesidades; por lo que se incluyó como técnica de elección para este fin.

El inóculo empleado fue de 1×10^6 epimastigotes resuspendidos en un volumen de 0.75 mL de una mezcla formada por SFB y DMSO (dimetilsulfóxido) en proporción de 1:9 empleando glicerina como sellador. Finalmente, el inóculo se vertió en un criovial y se colocó en un recipiente con paredes térmicas a una temperatura de -10°C durante 24 horas. Pasado éste periodo los crioviales se cambiaron a una temperatura de -70°C y se mantienen bajo estas condiciones hasta su uso.

IV.9 DETERMINACION DEL COMPORTAMIENTO CLONAL *IN VIVO*

- **CURVA DE PARASITEMIA**

Se ha demostrado, que la susceptibilidad a la infección con *T. cruzi* en ratón es influenciada directamente por la información genética de éstos²⁵. Los ratones de cepas consanguíneas son genéticamente más homogéneos; consecuentemente, la variabilidad de la respuesta a la infección en un ratón de cepa congénica puede deberse a cambios en la **infectividad** y/o **virulencia** de la **cepa del parásito**. Es por ello, que la **cepa** de ratón BALB-C fue la de elección para la evaluación de las curvas de parasitemia de las clonas obtenidas a partir de los tres aislados.

- **INFECCION A RATONES BALB-C**

La dosis empleada para la infección a ratones BALB-C se estableció en 2×10^6 epimastigotes por ratón en un volumen no mayor a 0.3 mL para cada una de las cinco clonas seleccionadas obtenidas a partir de cada **aislado**. La infección experimental se siguió mediante la cuantificación de tripomastigotes sanguíneos con hemocitómetro durante un periodo de 45 días postinfección, con determinaciones cada tercer día. El experimento se realizó por triplicado para

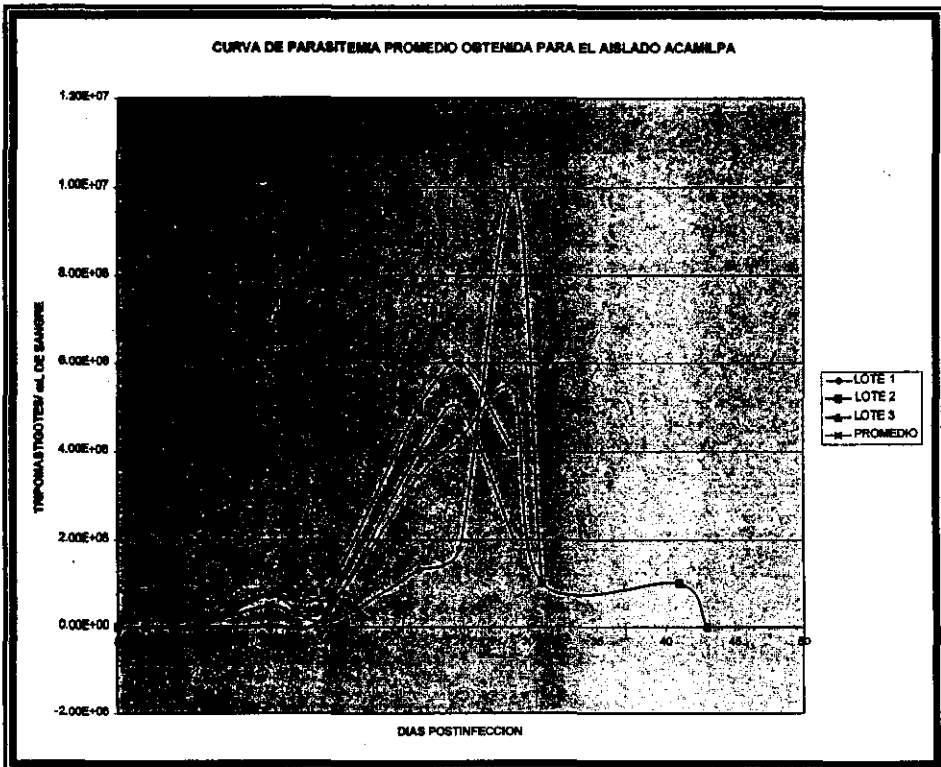
cada **clona** y se consideraron un control de manipulación y otro de medio de cultivo para cada lote.

RESULTADOS

V.1. COMPORTAMIENTO IN VIVO DE LOS AISLADOS

• AISLADO ACAMILPA

El resultado de la determinación del comportamiento in vivo del *aislado* Acamilpa llevado a cabo experimentalmente mediante la infección de tripomastigotes sanguíneos a ratones CD-1 se presenta en la siguiente gráfica de concentración de parásitos circulantes en función del tiempo.



Ratones: CD-1 Hembras 6-8 semanas de edad

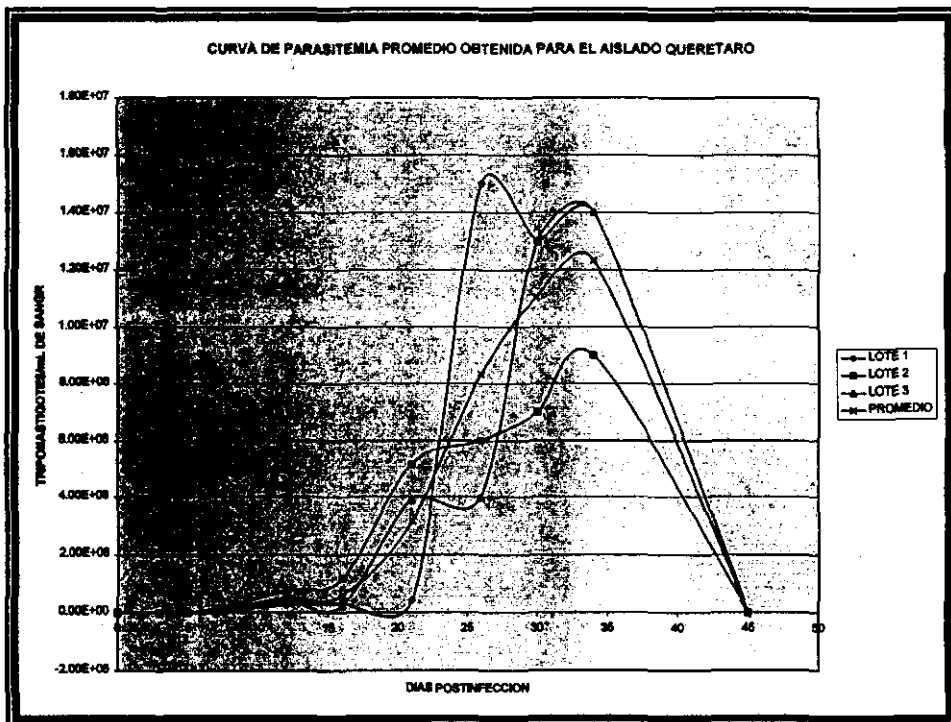
Inóculo: 1.0×10^8 tripomastigotes/mL de sangre

Dosis: 200 microlitros

Las curvas de parasitemia mostradas en la gráfica, indican en general una parasitemia considerablemente alta comprendida entre 5.0×10^6 y 1.0×10^7 tripomastigotes/ mL de sangre. El inicio de la observación de formas circulantes se verificó entre los 5 y 10 días postinfección y la terminación de las mismas alrededor del día 26-29.

• AISLADO QUERETARO

Las curvas de parasitemia obtenidas para cada uno de los tres lotes, determinadas mediante la evaluación de la infección experimental de *T. cruzi* inducida en ratones CD-1 con el *aislado* Querétaro; se observan en la siguiente gráfica de concentración de tripomastigotes sanguíneos en función del tiempo.



Ratones: CD-1 Hembras 6-8 semanas de edad

Inóculo: 1.0×10^6 tripomastigotes/ mL de sangre

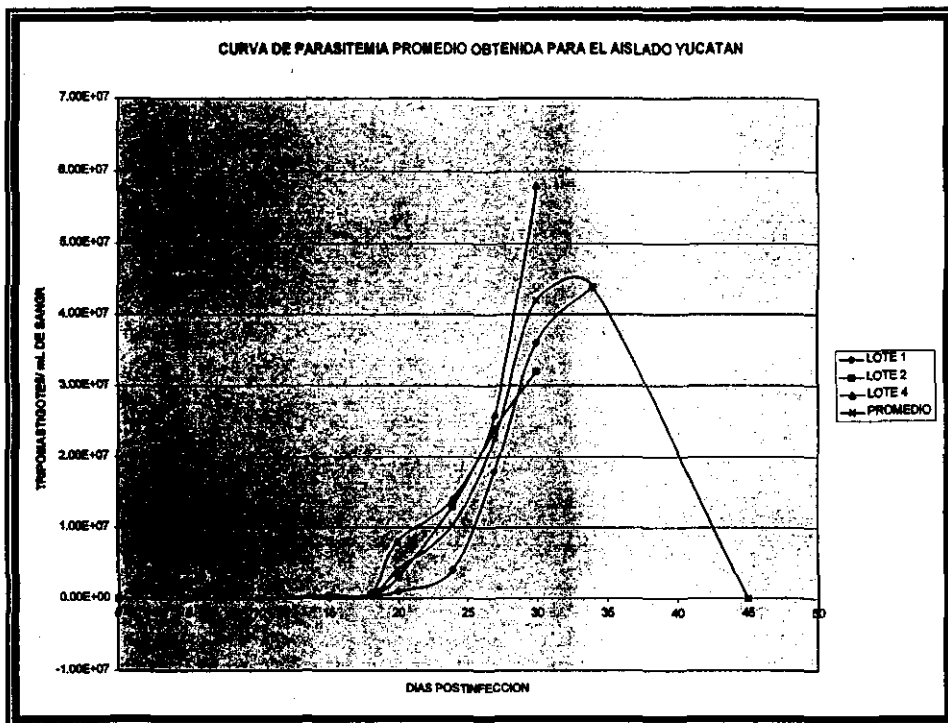
Dosis: 200 microlitros

Se puede analizar, que el comienzo de las formas circulantes se presentó entre los 10 y 20 días postinfección con un rango de concentración de parásitos que entre 9×10^6 y 1.5×10^7 tripomastigotes/mL de sangre; por lo que respecta al término de la parasitemia, se observa entre los 25 y 35 días postinfección.

Adicionalmente, es importante señalar que la patogenicidad del *aislado* Querétaro se manifestó claramente elevada en los ratones inoculados desde la aparición de formas circulantes; los cuales presentaron para todos los casos paralización de los miembros inferiores, edematización y fatiga durante el curso de la infección.

• AISLADO YUCATAN

La gráfica de las curvas de parasitemia obtenida por medio de la infección experimental a ratones CD-1 con el *aislado* Yucatán en función del tiempo se presenta a continuación.



Ratones: CD-1 Hembras 6-8 semanas de edad

Inóculo: 1.0×10^6 tripomastigotes/ mL de sangre

Dosis: 200 microlitros

Se observa un máximo de parasitemia de 5×10^7 tripomastigotes/mL de sangre, obtenido como promedio de las concentraciones de tripomastigotes sanguíneos para los tres lotes estudiados; dado que el porcentaje de mortalidad acumulada para este *aislado* fue del 100% antes de verificarse el descenso de la

infección. Cabe mencionar además, que la parasitemia obtenida para el **aislado** Yucatán fue la más alta de las tres poblaciones estudiadas en el proyecto.

V.2. DILUCION LIMITANTE 1

La técnica de **clonación** para T. cruzi por dilución limitante a partir de tripomastigotes sanguíneos no proporcionó un resultado satisfactorio. Se analizaron las placas inmediatamente después de la **clonación**, y se observó una gran cantidad de células sanguíneas en los pozos; hecho que de alguna manera dificultó la visibilidad para la realización de las lecturas iniciales, y con ello el aseguramiento de la existencia de un tripomastigote sanguíneo por pozo. Después de 60 días de incubación de la placa, los pozos inoculados tendieron a desecarse, dado que no se incubaron en condiciones de humedad; además, las células sanguíneas tendieron a sedimentar. Finalmente se paró el experimento sin observar ningún crecimiento.

Para explicar este resultado, se puede mencionar adicionalmente que el medio de cultivo DMEMc, pudo no haber sido óptimo para el desarrollo del **parásito**.

V.3. PURIFICACION DE TRIPOMASTIGOTES SANGUINEOS

- **CROMATOGRAFIA DE COLUMNA DE INTERCAMBIO ANIONICO CON DEAE CELULOSA**

La técnica de purificación de tripomastigotes sanguíneos llevada a cabo mediante cromatografía de columna por intercambio aniónico con DEAE-celulosa se verificó con un rendimiento pobre; por lo que no se consideró como la de elección para la purificación y concentración de parásitos previa a la técnica de **clonación** a estandarizar.

Mercado y Katusha reportaron un rendimiento de la técnica que consideraba la viabilidad del 45 al 58% de parásitos con respecto a la concentración inicial de tripomastigotes en la muestra sanguínea, con un máximo de elución de formas circulantes aproximadamente a los 30 minutos de iniciar el corrimiento de la columna²². Sin embargo, los resultados obtenidos experimentalmente en el estudio mostraron que el rendimiento de la técnica al parecer se encuentra influido por factores adicionales; tales como el volumen de sangre de la muestra inicial, y la concentración de parásitos correspondiente.

Sería importante añadir, que la técnica de purificación de parásitos por cromatografía de intercambio aniónico pudiera llevarse a cabo con mejor rendimiento si se contara con concentraciones iniciales mayores de parásitos; que puede ser el caso de otros aislados diferentes a los empleados en este estudio, ya que durante el procedimiento y los lavados se pierde gran cantidad de tripomastigotes sanguíneos, sin dejar de mencionar que durante la etapa de adaptación al medio de cultivo esto ocurre también.

Es importante mencionar también, que el experimento se realizó a una escala menor a la reportada en la literatura; lo que pudo también haber influido directamente en el tiempo de elución de las formas circulantes, el cual ocurrió inicialmente a los 48 minutos aproximadamente, presentando un máximo a los 51 minutos y un término a los 57 minutos. De esta manera, los resultados del rendimiento de la técnica en sus diferentes fases se observan en la siguiente tabla.

| Procedimiento | Acamilpa | | Querétaro | | Yucatán | |
|--------------------------|-------------------|------|-------------------|-------|-------------------|-------|
| | Conc. | % | Conc. | % | Conc. | % |
| Extracción directa | 7.5×10^6 | 100 | 1.2×10^7 | 100 | 7.0×10^6 | 100 |
| Gradiente con Hystopaque | 5.0×10^6 | 66.6 | 7.0×10^6 | 58.3 | 4.0×10^6 | 57.14 |
| Después de los lavados | 1.0×10^6 | 13.3 | 2.0×10^6 | 16.66 | 1.0×10^6 | 14.28 |

Tabla 4. Rendimiento de la técnica de purificación y concentración de tripomastigotes sanguíneos por columna de intercambio aniónico con DEAEc

El rendimiento de la técnica, se calculó cuantificando la concentración de organismos viables al final de los lavados, con respecto a la concentración de parásitos obtenidos después de realizar el gradiente con Hystopaque y la concentración de tripomastigotes sanguíneos inicial.

- **GRADIENTE DE SEPARACION CON FICOLL-HYPAQUE**

El gradiente de separación de tripomastigotes sanguíneos llevado a cabo con Ficoll-Hypaque funcionó satisfactoriamente; por consiguiente, se utilizó como de primera elección para la purificación y concentración de tripomastigotes sanguíneos previa a la técnica de *clonación*. El rendimiento mediante esta técnica se muestra en la siguiente tabla.

| Aislado | Rendimiento | | | |
|-----------|-------------------|-----|-------------------|----|
| | Conc. Inicial | % | Conc. final | % |
| Acamilpa | 6.4×10^6 | 100 | 5.0×10^6 | 81 |
| Yucatán | 6.0×10^6 | 100 | 4.0×10^6 | 79 |
| Querétaro | 8.0×10^6 | 100 | 7.0×10^6 | 87 |

Tabla 5. Rendimiento de la técnica de purificación y concentración de tripomastigotes sanguíneos por gradiente de separación con Ficoll-Hypaque.

V.4. DILUCION LIMITANTE 2

La técnica de *clonación* por dilución limitante realizada a partir de tripomastigotes sanguíneos purificados, no proporcionó resultados satisfactorios. Aún cuando se constató la presencia de un tripomastigote inicialmente en cada uno de los pozos inoculados, parece que el medio de cultivo empleado RPM1c no fue el óptimo para el desarrollo de los parásitos. Cabe mencionar además, que la placa se incubó en condiciones de humedad; por lo que la desecación de los pozos no se llevó a cabo, y por lo tanto no constituye un factor determinante para la falta de crecimiento de organismos. A los 45 días postinoculación se detuvo el experimento sin obtener resultados ningún desarrollo.

De esta forma se presume que la técnica de **clonación** por dilución limitante a partir de tripomastigotes sanguíneos purificados bajo las condiciones experimentales mencionadas, no es la técnica de elección para efectos de **clonación** de T. cruzi.

V.5. DILUCION LIMITANTE 3

La técnica de **clonación** por dilución limitante realizada a partir de epimastigotes, prácticamente funcionó en cuanto a desarrollo de parásitos; pero se rechazó debido a que durante la realización de la misma, la probabilidad de obtener un solo epimastigote para la inoculación de los pozos fue casi nula.

El mantenimiento *in vitro* del **parásito** implica por sí mismo la formación de rosetas y otras entidades pluricelulares; dado lo anterior, el desarrollo mediante estas condiciones no resultaría confiable para fines de **clonación**.

- **VERIFICACION DE LA CAPACIDAD INFECTANTE DE LOS CULTIVOS OBTENIDOS A PARTIR DE LOS AISLADOS**

Derivado del conocimiento de que el mantenimiento *in vitro* del **parásito** por largos periodos en el laboratorio implica la posibilidad de la modificación de la capacidad infectante de la población en estudio; se llevó a cabo un experimento que pusiera en evidencia la permanencia de esta característica para los cultivos de T. cruzi obtenidos de los aislados empleados en el estudio.

El experimento se realizó mediante la inoculación a ratones CD-1 con los cultivos obtenidos a partir de los aislados Acamilpa, Yucatán, y Querétaro; mismos que después de un periodo establecido, se les practicó un análisis microscópico para la observación de tripomastigotes sanguíneos. Al término de las observaciones se sacrificaron los animales empleados en el experimento.

Los resultados obtenidos del experimento de verificación de la capacidad infectante, se muestran en la siguiente tabla.

| Stock | dosis (epimastigotes/mL) | Volumen (mL) | parasitemia a los 20 días postinfección | | | |
|-----------|-----------------------------|-----------------|---|----------|----------|----------|
| | | | ratón 1 | ratón 2 | ratón 3 | control |
| Acamilpa | 2X10 ⁶ | 0.3 | positiva | positiva | positiva | negativa |
| Yucatán | 2X10 ⁶ | 0.3 | positiva | positiva | positiva | negativa |
| Querétaro | 2X10 ⁶ | 0.3 | positiva | positiva | positiva | negativa |

Tabla 6. Resultados de la verificación de la capacidad infectante de los cultivos de los aislados, Acamilpa, Yucatán y Querétaro. Ratón: CD-1 Hembras 6-8 semanas de edad

Se pudo analizar con base en los resultados obtenidos microscópicamente, que la parasitemia se presentó para todos los ratones; en el caso de los controles utilizados, se puede mencionar que no mostraron ningún tipo de alteración durante el tiempo de seguimiento del experimento, por lo que se considera como satisfactorio el resultado y la permanencia de la capacidad infectante de los cultivos. Es decir, que no se modificó la *infectividad* de los aislados con la manipulación experimental del *parásito* hasta su adaptación *in vitro* (Fig. 15) y durante el desarrollo del estudio.

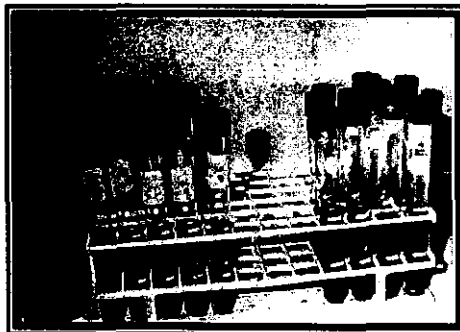


Fig. 15. Cultivos de *T. cruzi*

V.6. CLONACION POR CRECIMIENTO Y AISLAMIENTO DE COLONIAS SOBRE MEDIO SOLIDO

La técnica de *clonación* por crecimiento y aislamiento de colonias sobre medio sólido, se comprobó sólo para *aislado* Yucatán mediante la observación de crecimiento visible a los 63 días posterior a la incubación de las placas. Las colonias obtenidas presentaron un color amarillo oscuro con un tamaño aproximado de 1.5 – 2.0 mm de diámetro. Cabe señalar además, que las colonias se depositaron al fondo de las placas y en las placas inoculadas con las concentraciones respectivas a 500 y 1000 epimastigotes; posteriormente se procedió a aislarlas para su adaptación en LITc, sin obtener ningún crecimiento de las mismas.

Varios factores influyeron probablemente para explicar los resultados obtenidos mediante esta técnica de *clonación*. Por un lado, la concentración del agar, y por otro el inóculo empleado. La concentración del agar empleada para la técnica se estableció en 1.5% en LITc; dada esta concentración, se observó que conforme transcurrió el tiempo de incubación, el medio LITc-agar de las placas se fue deshidratando poco a poco. Adicionalmente a este hecho, se observó que la dureza del agar dada la concentración pudo haber disminuido también la movilidad necesaria para el desarrollo de *T. cruzi*.

Por lo que respecta al inóculo, se puede inferir que el inóculo fue muy bajo en concentración de parásitos para la obtención de un rendimiento óptimo; ya que solo se observó crecimiento de colonias en las placas inoculadas con una concentración mayor a 500 epimastigotes.

V.7. TECNICA DE CLONACION MODIFICADA POR FORMACION DE COLONIAS Y CRECIMIENTO EN AGAR

La técnica modificada de *clonación* por formación de colonias y crecimiento en agar se llevó a cabo eficazmente para los tres aislados empleados. Es por ello, que se consideró como la de primera elección con fines de *clonación* para T. cruzi. Derivado de los resultados obtenidos a continuación se presenta una breve explicación del desarrollo de la técnica.

Inicialmente, a partir de los cultivos de T. cruzi obtenidos para los tres aislados se realizó la cuantificación de parásitos viables, los resultados se ilustran en la siguiente tabla:

| Aislado | Epimastigotes/ mL | dilución | Concentración final (epimastigotes/mL) |
|-----------|-------------------|----------|--|
| Querétaro | 6.8×10^7 | 1: 1000 | 6.8×10^4 |
| Acamilpa | 2.4×10^6 | 1: 100 | 2.4×10^4 |
| Yucatán | 6.7×10^6 | 1: 100 | 6.7×10^4 |

Tabla 7. Concentración inicial de los cultivos de T. cruzi obtenidos a partir de los aislados Acamilpa, Yucatán y Querétaro para la técnica modificada de clonación por formación de colonias y crecimiento en agar

Con base en estas concentraciones; se realizaron las diluciones necesarias para la obtención de los inóculos correspondientes a las placas hasta obtener 500, 1000, 2500, y 5000 epimastigotes por cada 10 ml de LITc por *aislado*. Los inóculos empleados se muestran a continuación.

| Placa | Aislado | Conc. | μL de dilución final + c.b.p 5mL LIT + 5 mL de medio de agar- LIT 0.75%) |
|-------|-----------|---------|---|
| 1 | Querétaro | 500 | 7.25 |
| 2 | Querétaro | 1000 | 14.5 |
| 3 | Querétaro | 2500 | 36.28 |
| 4 | Querétaro | 5000 | 72.56 |
| 5 | Control | ninguna | |
| 6 | Yucatán | 500 | 7.5 |
| 7 | Yucatán | 1000 | 14.92 |
| 8 | Yucatán | 2500 | 37.31 |
| 9 | Yucatán | 5000 | 74.62 |
| 10 | Control | ninguna | |
| 11 | Acamilpa | 500 | 20.80 |
| 12 | Acamilpa | 1000 | 41.60 |
| 13 | Acamilpa | 2500 | 104.1 |
| 14 | Acamilpa | 5000 | 208.3 |
| 15 | Control | ninguna | |

Tabla 8. Inóculos de *T. cruzi* de los aislados Acamilpa, Yucatán y Querétaro para la preparación de placas para la técnica modificada de clonación por formación de colonias y crecimiento en agar.

Posteriormente; tras un periodo de incubación a los 24 días de incubación, se observaron las primeras colonias en las placas inoculadas con los aislados Yucatán y Acamilpa. Para los 27 días de incubación las colonias tenían un diámetro de 1mm aproximadamente, y a los 40 días eran francamente visibles con un diámetro de 2mm; las colonias presentaron forma esférica consistencia lisa con color amarillo-beige (Fig. 14)

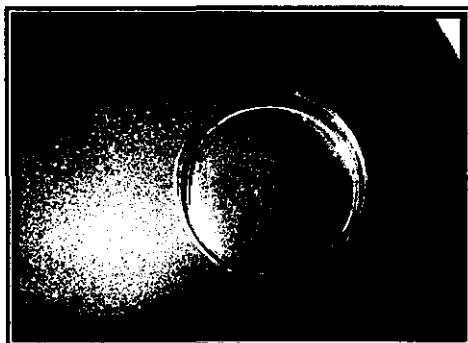


Fig. 14 Aspecto de las colonias de T. cruzi a los 40 días de incubación.

A los 60 días de incubación se realizó el aislamiento de las colonias para su adaptación y mantenimiento en LITc (Fig. 15). Es importante mencionar, que para el caso de las placas inoculadas con los cultivos obtenidos a partir del *aislado* Querétaro, el crecimiento y la aparición de colonias fue más lento que para los otros dos casos; por lo que a los 60 días de incubación solamente se había observado la aparición de 5 colonias aisladas de 1 mm de diámetro aproximadamente.

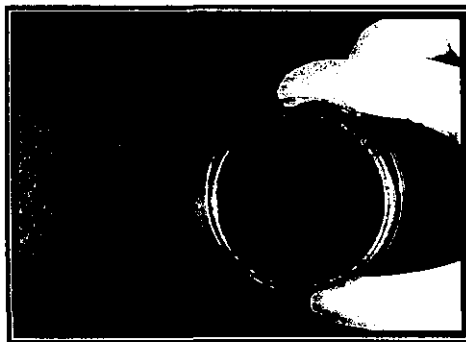


Fig. 15. Aspecto de las colonias de T. cruzi obtenidas a partir del aislado Acamilpa mediante la técnica modificada de formación de colonias y crecimiento a los 60 días de incubación.

Las observaciones al microscopio invertido de algunas de las colonias a los 60 días de incubación son las siguientes:



Fig. 16. Observación de una colonia de *T. cruzi* obtenida a partir de la inoculación del aislado Yucatán mediante la técnica modificada de clonación por formación de colonias y crecimiento(20X)

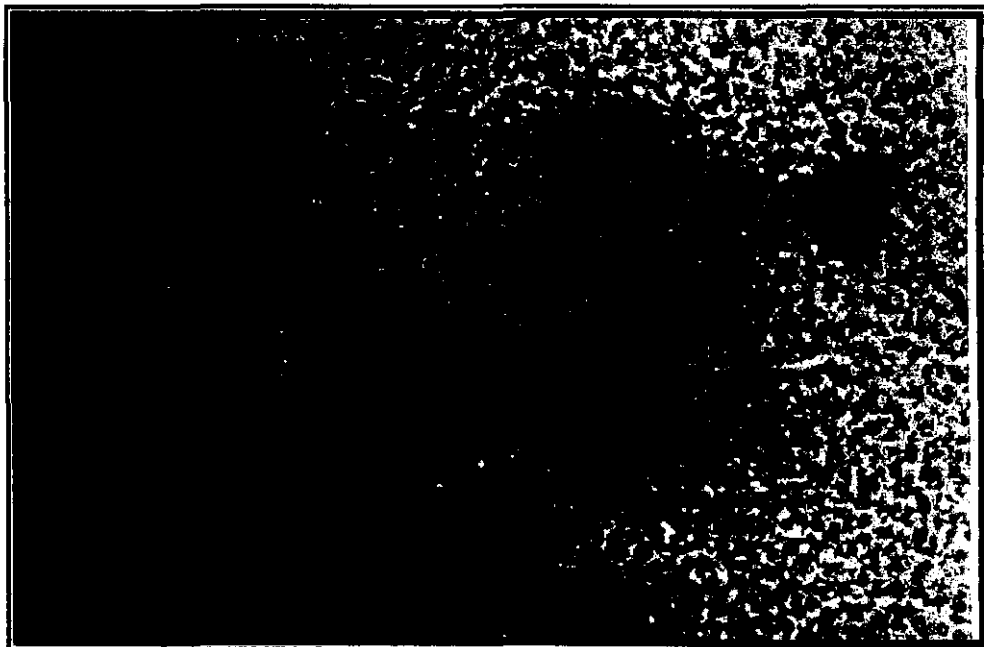


Fig. 18 Epimastigotes de *T. cruzi* pertenecientes a una colonia obtenida a partir del aislado Yucatán mediante la técnica modificada de clonación por formación de colonias y crecimiento en agar (40X)

V.7. OBTENCION DE CLONAS POR LA TECNICA MAS EFICAZ

De acuerdo con los resultados obtenidos, se estableció que la técnica de **clonación** para aislados mexicanos de *T. cruzi* más eficaz de las estudiadas fue la técnica modificada de formación de colonias y crecimiento en agar. Mediante esta técnica, se obtuvieron un total de 5 clonas a partir del **aislado** Querétaro de sus tres respectivas placas; 93 a partir del **aislado** Yucatán, y 84 para el caso del **aislado** Acamilpa. El rendimiento obtenido por placa para cada **aislado** se muestra en la siguiente tabla.

| Aislado | Placa | Conc. | Núm. de colonias observadas | Núm. de colonias seleccionadas | Numeración asignada a las colonias seleccionadas |
|-----------|-------|-------|-----------------------------|--------------------------------|--|
| Querétaro | 1 | 500 | 0 | 0 | |
| Querétaro | 2 | 1000 | 0 | 0 | |
| Querétaro | 3 | 2500 | 1 | 1 | 1 |
| Querétaro | 4 | 5000 | 4 | 4 | 2, 3, 4, 5 |
| Yucatán | 6 | 500 | 6 | 2 | 9, 10 |
| Yucatán | 7 | 1000 | 18 | 7 | 1, 2, 3, 4, 5, 11, 12 |
| Yucatán | 8 | 2500 | 15 | 4 | 6, 7, 8, 13 |
| Yucatán | 9 | 5000 | 54 | 0 | |
| Acamilpa | 11 | 500 | 1 | 0 | |
| Acamilpa | 12 | 1000 | 10 | 8 | 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 13 |
| Acamilpa | 13 | 2500 | 7 | 4 | 1, 2, 3, 4 |
| Acamilpa | 14 | 5000 | 58 | 1 | 11 |

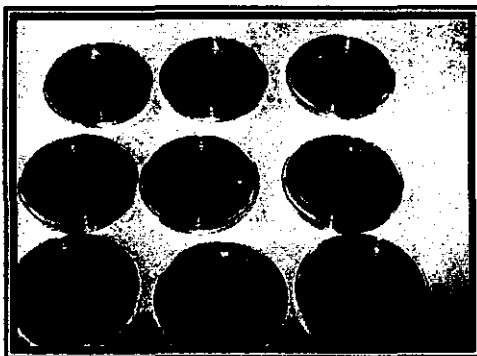
Tabla 9. rendimiento obtenido a partir de la técnica de clonación por crecimiento clonal en medio semisólido modificada.

Se puede mencionar con base en estos resultados, que el rendimiento obtenido muestra relación directa con la población en estudio, y proporción con respecto a la concentración de epimastigotes inoculados en la placa. Dado el número de clonas obtenidas, se realizó la selección de algunas para la determinación del comportamiento clonal *in vivo*; previa adaptación y mantenimiento de las mismas en LITc. Por otra parte, las clonas no

seleccionadas para este efecto se procedió a identificarlas, numerarlas, adaptarlas *in vitro* para posteriormente criopreservarlas.

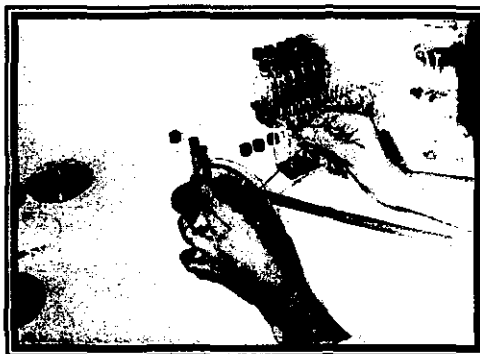
El procedimiento de aislamiento, adaptación y mantenimiento en LITc de las clonas obtenidas, se llevó a cabo en tres fases principales que se ilustran a continuación:

Fase 1. Observación y registro de las colonias obtenidas



Fase 2. Selección de las colonias y aislamiento de medio sólido



Fase 3. Incorporación a LITc para su adaptación y mantenimiento**V.8. COMPORTAMIENTO CLONAL IN VIVO**

El comportamiento *in vivo* de las clonas obtenidas a partir de los aislados Acamilpa y Yucatán se realizó mediante la infección experimental de cinco clonas seleccionadas para este fin. A continuación se listan en la siguiente tabla.

| Aislado | Clona proveniente de la placa número | Núm. de colonia asignado | Clave asignada a la clona |
|----------|--------------------------------------|--------------------------|---------------------------|
| Acamilpa | 4 | 11 | A.1 |
| Acamilpa | 2 | 12 | A.2 |
| Acamilpa | 2 | 9 | A.3 |
| Acamilpa | 2 | 6 | A.4 |
| Acamilpa | 1 | 3 | A.5 |
| Yucatán | 3 | 4 | Y.1 |
| Yucatán | 3 | 5 | Y.2 |
| Yucatán | 3 | 7 | Y.3 |
| Yucatán | 2 | 9 | Y.4 |
| Yucatán | 1 | 11 | Y.5 |

Tabla 10. Clonas obtenidas a partir de los aislados Acamilpa y Yucatán seleccionadas para la determinación de l comportamiento *in vivo*.

Por lo que respecta al caso de las 5 clonas obtenidas a partir del *aislado* Querétaro; cabe señalar, que al parecer estas no lograron adaptarse al LITc, por consiguiente para efecto de mantenimiento y determinación del comportamiento *in vivo*, no se obtuvieron resultados.

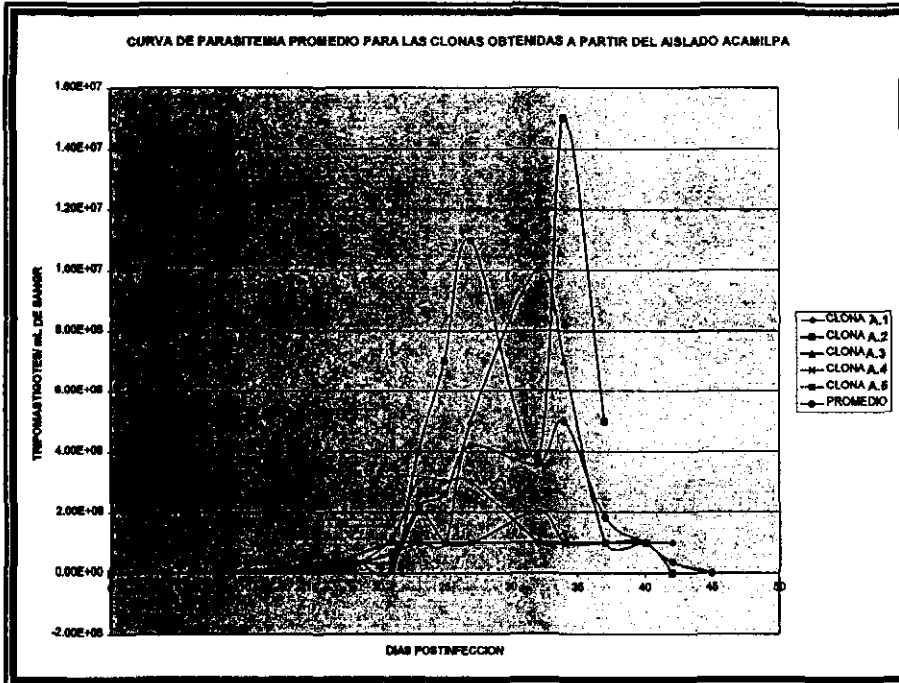
De esta manera, se formaron así entonces dos lotes con un total de 15 ratones cada uno para la determinación del comportamiento *in vivo*. El esquema de inoculación se muestra a continuación:

| Aislado inoculado | Clona inoculada (por triplicado) | volumen inoculado (ml) |
|-----------------------------|---|-------------------------------|
| Yucatán | Y.1 | 0.3 |
| Yucatán | Y.2 | 0.3 |
| Yucatán | Y.3 | 0.3 |
| Yucatán | Y.4 | 0.3 |
| Yucatán | Y.5 | 0.3 |
| Acamilpa | A.1 | 0.3 |
| Acamilpa | A.2 | 0.220 |
| Acamilpa | A.3 | 0.330 |
| Acamilpa | A.4 | 0.260 |
| Acamilpa | A.5 | 0.3 |
| Control de medio de cultivo | Ninguna | 0.3 |
| Control sin manipulación | | ninguno |
| Control sin manipulación | | ninguno |

Tabla 3. Esquema de inoculación para la determinación del comportamiento clonal *in vitro*

• **COMPORTAMIENTO *IN VIVO* DE LAS CLONAS OBTENIDAS A PARTIR DEL AISLADO ACAMILPA**

El resultado de la evaluación del comportamiento *in vivo* de las clonas obtenidas a partir del *aislado* Acamilpa, llevado a cabo mediante la inoculación a ratones Balb-C con las clonas correspondientes en función de tiempo, se muestra en la siguiente gráfica.



Ratones: BALB-C Hembras 3-6 semanas de edad

Inóculo: 2.0×10^6 epimastigotes/ mL de sangre

Dosis: 300 microlitros

Las curvas de parasitemia mostraron un comportamiento heterogéneo en general para las clonas estudiadas; el cual podría explicarse más detalladamente si formamos 2 grupos independientes para su análisis. El grupo 1 formado por la *clona* A.2 y A.3 y el grupo 2 constituido por las clonas A.1, A.4 y A.5.

Las clonas pertenecientes al grupo 1, presentaron parasitemias comprendidas entre los 1×10^7 y 1.5×10^7 tripomastigotes por mililitro de sangre; mientras que para el caso de las clonas pertenecientes al grupo 2, se manifestaron con un rango entre 1×10^8 y 3×10^8 tripomastigotes por mililitro de sangre.

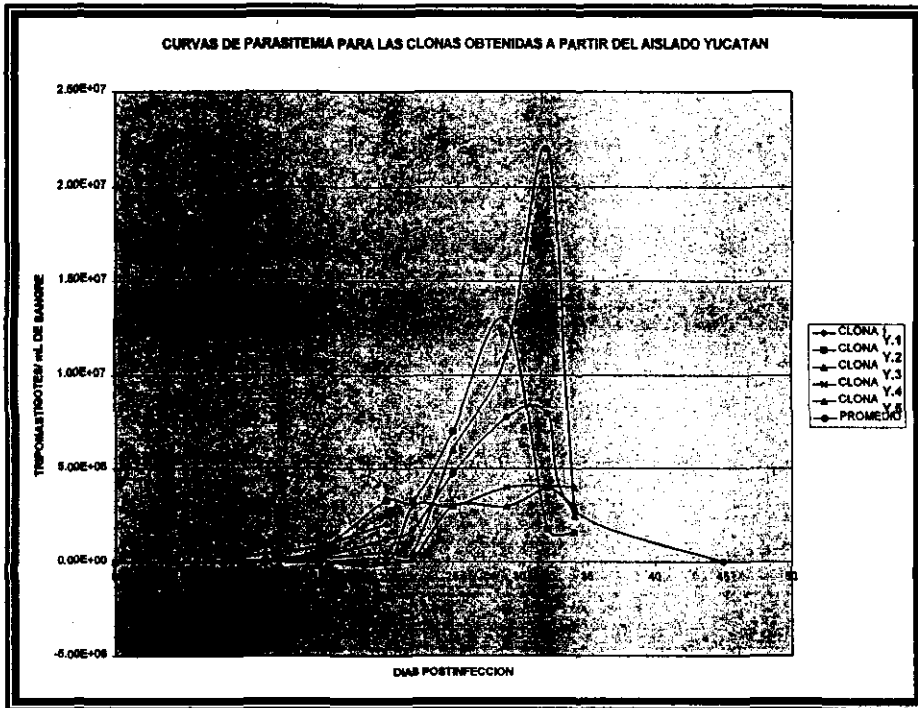
Los máximos de parasitemia también mostraron diferencias significativas; considerando que para las clonas del grupo 1 el máximo se presentó a los 35 días postinfección aproximadamente, y para las clonas pertenecientes al grupo 2 un rango más amplio comprendido entre los 25 y 35 días postinfección. Cabe mencionar además, que para el caso de las clonas A.2 y A.3, los resultados obtenidos podrían explicarse con base en el origen de las mismas; ya que provienen de la misma placa, lo que de alguna manera justificaría el comportamiento *in vivo* similar obtenido para estas clonas. Sin embargo, para el caso de las clonas A.1, A.4 y A.5 no se justificaría mediante este hecho, ya que provienen de diferentes placas y no se observan diferencias significativas en el curso de las parasitemias.

El comportamiento *in vivo* de las clonas en estudio, refleja un resultado interesante que se podría explicar en términos de heterogeneidad intrapoblacional; resumiendo que existe un comportamiento similar entre las clonas A.2 y A.3, y otro diferente para las clonas A.1, A.4 y A.5. Lo que nos lleva a pensar en la posibilidad de la existencia de por lo menos dos clonas diferentes en el *aislado* Acamilpa.

Los resultados obtenidos también sugieren por sí mismos la repetición del experimento, el análisis a nivel molecular de las clonas y la determinación del comportamiento de las clonas restantes que fueron criopreservadas, a fin de compararlas con los obtenidos.

• **COMPORTAMIENTO *IN VIVO* DE LAS CLONAS OBTENIDAS A PARTIR DEL AISLADO YUCATAN**

El resultado derivado de la infección a ratones Balb-C con los cultivos obtenidos a partir del *aislado* Yucatán, con el fin de obtener el comportamiento *in vivo* del mismo; permitió obtener la siguiente gráfica de concentración de tripomastigotes sanguíneos en función del tiempo.



Ratones: BALB-C Hembras 3-6 semanas de edad

Inóculo: 2.0×10^6 epimastigotes/ mL de sangre

Dosis: 300 microlitros

La gráfica en general muestra tres comportamientos diferentes entre las clonas estudiadas. El máximo de parasitemia se encontró en 2.25×10^7 tripomastigotes por mililitro de sangre para el caso de la **clona** Y.5., 1.25×10^7 para la **clona** Y.2., y 4×10^6 para las clonas restantes. El comienzo de la parasitemia se verificó entre los 5 y los 15 días postinfección para todos los casos, con un máximo de parasitemia ocurrido entre los 25 y 30 días postinfección.

Mediante esta gráfica se pudo observar además, que la **clona** Y.1 tuvo un 100 por ciento de mortalidad acumulada al llegar a los 20 días postinfección aproximadamente; lo que nos limita en cierto modo para poder realizar un análisis del comportamiento de esta **clona**, con respecto a las clonas Y.3. y Y.4.

Nuevamente, para este caso podemos sugerir una explicación del comportamiento clonal *in vivo* obtenido a través de la manifestación de la característica de heterogeneidad intrapoblacional. El comportamiento de la **clona** Y.5 nos sugiere pensar que quizá se trate de una **clona** diferente a la **clona** Y.2, y otra diferente a las clonas Y.3 y Y.4.; excluyendo a Y.1. por falta de puntos para un análisis completo. De cualquier manera, aún cuando las características de desarrollo de la infección con las diferentes clonas parecen ser muy similares; las curvas de parasitemia obtenidas se observan claramente diferenciadas en tres ocasiones.

Este comportamiento nos lleva a pensar en la existencia de por lo menos tres diferentes clonas en el **aislado** Yucatán; por lo que tal como se sugiere para el caso del análisis de resultados de los estudios realizados con el **aislado** Acamilpa, se propone la repetición del experimento y el análisis molecular completo de las clonas.

VI. DISCUSION

Cepas virulentas de *T. cruzi* han sido clonadas mediante diversas técnicas, tales como la inoculación experimental de tripomastigotes sanguíneos a un ratón, la dilución serial en medio líquido, o bien mediante el plaqueo de diferentes diluciones de suspensiones de parásitos en medio sólido con la subsecuente selección de las colonias aisladas. Cabe señalar además, que de las técnicas mencionadas, la inoculación experimental de un tripomastigote sanguíneo ha sido empleada para demostrar experimentalmente que un sólo organismo puede establecer una infección en mamíferos.

Así mismo, también se ha utilizado con este fin otra técnica diferente, la cual involucra el cultivo *in vitro* de *T. cruzi*, que consiste en la inoculación de cultivos constituidos por microgotas conteniendo un sólo parásito; mismo que previamente ha sido observado microscópicamente ¹⁴.

En cuanto a las ventajas de las técnicas de **clonación** por dilución serial y en agar se encuentran la reproducibilidad. Sin embargo, a estas técnicas también se les atribuye poca confiabilidad; según lo explica Miles, dado que el **parásito** no es observado microscópicamente durante el proceso de **clonación**. Respecto a la técnica de **clonación** en agar, adicionalmente a lo mencionado; Goldberg y Chiari en 1980, basados en otros estudios relacionados reportaron la técnica como la más confiable y reconocida internacionalmente para efectos de **clonación** a parásitos flagelados.

Los resultados obtenidos para el establecimiento del diseño de una técnica de **clonación** eficaz a través del presente estudio, nos llevan a un análisis de factores importantes a considerar; independientemente de la técnica con fines de **clonación** para el **parásito** que se aplique. Entre estos, se encuentran a grandes

rasgos la dimensión, la característica de flagelado, y las condiciones necesarias para el desarrollo; lo que complica aún más el diseño de dicha técnica.

Es conveniente recordar además, que la fase infectante de *T. cruzi* de la que parte cualquier técnica de **clonación**, requiere necesariamente de la conversión de tripomastigote sanguíneo a epimastigote; lo que representa cierta dificultad adicional a considerar para el establecimiento de la técnica de **clonación** eficaz, ya que la probabilidad de que sólo un tripanosoma experimentalmente posea la suficiente capacidad infectante para convertirse en epimastigote es casi nula.

En este aspecto, también es importante mencionar, que el manejo en fase de epimastigote *in vitro* ó *in vivo* por largos periodos, implica la posibilidad de que exista atenuación de la población, o bien disminución de la capacidad infectante de ésta; y por lo tanto, que el resultado obtenido bajo estas condiciones sea poco confiable o limitado para efectos de **clonación**.

Es este estudio, se emplearon básicamente dos técnicas para **clonación** del **parásito** de las reportadas en la literatura: la dilución serial, y el crecimiento clonal en agar. La dilución serial se llevó a cabo con dos modalidades, la **clonación** a partir de tripomastigotes sanguíneos extraídos directamente de la muestra sanguínea, y la **clonación** a partir de tripomastigotes sanguíneos purificados.

Por lo que respecta a la técnica de crecimiento clonal en agar, debe mencionarse, que se realizó como respuesta a factores que dificultaron el procedimiento de la técnica de **clonación** por dilución serial; mismos que fueron observados desde la aplicación de la misma. Podemos explicar los resultados por la observación de dos factores: la interferencia de células sanguíneas en el

proceso de **clonación**, y el uso de un medio de cultivo óptimo que permitiera el desarrollo del microorganismo.

La interferencia de células sanguíneas se resolvió mediante la implementación de un procedimiento de purificación y concentración de parásitos previo a la técnica de **clonación**; este procedimiento permitió obtener tripanosomas viables libres de interferencias, los cuales incorporados al medio de cultivo óptimo a su desarrollo, dieron como consecuencia la base para el establecimiento de las condiciones necesarias para la técnica de **clonación** a estandarizar.

Por lo que concierne a los medios de cultivo DMEMc y RPMIc, derivado de los resultados obtenidos; se puede analizar que no fueron los óptimos para el crecimiento de *T. cruzi*.

La implementación del procedimiento de purificación y concentración de parásitos evaluadas en el estudio consistió en la aplicación de dos técnicas de separación aplicadas comúnmente con fines diferentes: el gradiente de separación con Ficoll-Hypaque, y la cromatografía por intercambio aniónico con DEAEc.

Por un lado, el gradiente de separación con Ficoll-Hypaque mostró rendimientos considerablemente elevados; comparados con la técnica de cromatografía de columna por intercambio aniónico con DEAEc. De esta manera, la aplicación del gradiente, permitió obtener la concentración inicial necesaria de parásitos para la aplicación de la técnica de **clonación**; incluso considerando que algunos no pudieran sobrevivir al procedimiento, ya que el procedimiento por si mismo sugiere la incorporación y la adaptación de un buen número de organismos viables para su adaptación *in vitro*, pero también la pérdida de gran número de estos.

Por otro lado, contrariamente a este resultado; la técnica de purificación y concentración de parásitos mediante cromatografía de intercambio aniónico con DEAE celulosa, proporcionó un rendimiento pobre, laborioso y con un requerimiento mayor de tiempo para su realización.

Posteriormente, tratando de solucionar el inconveniente de la probabilidad de supervivencia y viabilidad de la fase de tripomastigote sanguíneo a epimastigote en el desarrollo de la técnica de **clonación** por dilución serial, surgió la idea de implementar una variante a partir de la fase de epimastigote; sin embargo, la observación de rosetas y la probabilidad de obtener un epimastigote en un solo pozo también resultó poco funcional y eficaz. Adicionalmente, el desarrollo de ésta técnica incluyó además el uso de otro medio de cultivo diferente a los empleados; el medio de cultivo de LITc, el cual permitió realizar indirectamente un análisis de medios de cultivo empleados.

Es importante mencionar que el medio LITc, se estableció como el medio de elección para estudios posteriores; ya que comparado con los otros dos medios de cultivo DMEMc y RPMc, presentó el mejor rendimiento en función de crecimiento y adaptación de los parásitos.

A partir de este momento, se marcó una primera fase de trabajo, y se definió la línea de las investigaciones posteriores con un perfil determinado de los requerimientos a considerar para la técnica de **clonación** a estandarizar. A grandes rasgos se establecieron los siguientes:

- 1) Que la técnica de clonación a estandarizar se realizara a partir de la fase de epimastigote
- 2) Que se considerara el empleo del medio de LITc como sustrato para asegurar el desarrollo del parásito bajo condiciones óptimas.

- 3) Que la técnica de **clonación** permitiera la observación del **parásito** desde su aplicación, hasta la obtención de clonas; con el fin de evitar confusión tanto en lecturas iniciales del experimento, como en el resultado.

Derivado de las condiciones mencionadas, se consideró la segunda modalidad de las técnicas de **clonación** propuestas: la de crecimiento clonal en agar; la cual en primera instancia cubrió el perfil deseado. Para este efecto, se estudiaron dos variantes a la técnica: la **clonación** por crecimiento y aislamiento de colonias en medio sólido, y la **clonación** por formación de colonias y crecimiento.

Esta última involucró ciertas modificaciones a la técnica reportada por Wittner y cols. en 1982; las cuales consistieron básicamente en el empleo de la concentración de agar al medio de cultivo LITc, la cantidad de inóculo considerado para las placas, y las condiciones de incubación de estas. La técnica resultó posible, aunque en un periodo mayor de incubación al reportado en la literatura, y solamente para el **aislado** Yucatán. Como dato adicional, se puede mencionar, que el tiempo de incubación hasta la observación de las primeras colonias implicó la deshidratación paulatina del medio de cultivo; con la consecuente probable disminución de la viabilidad de los parásitos, por lo que se consideró el empleo de una concentración menor de agar.

Así mismo, con la técnica de crecimiento y aislamiento de colonias en medio sólido, se puso de manifiesto el inconveniente de la sedimentación de colonias al fondo de la placa, hecho por el cual no existió la seguridad de obtener colonias provenientes de una sola célula; ya que el parásito pudo haberse desplazado en la superficie interna de la placa. Sin embargo, la funcionalidad de la técnica, llevó a estudiar la segunda variante: la técnica modificada de clonación

por formación de colonias y crecimiento en agar basada en la técnica reportada por Goldberg y cols., en 1980.

En esta técnica, se consideró una modificación a la reportada por los autores, la cual consistió básicamente en una placa formada por una bicapa de LITc-agar y no una capa como la mencionada; una bicapa formada con LITc-agar de diferente dureza. La capa superior de la placa, es donde se lleva a cabo el crecimiento del **parásito**, y dada la dureza del agar, permitió la movilidad necesaria a los epimastigotes para su desarrollo y la tensión suficiente para evitar su desplazamiento por la superficie.

Con esta modificación, las colonias obtenidas se depositaron al fondo de dicha capa, por lo que su aislamiento y desarrollo resultaron favorecidos. La técnica **clonación** por formación de colonias y crecimiento en agar demostró experimentalmente ser la más eficaz de las dos variantes evaluadas en el estudio, ya que aún cuando los rendimientos obtenidos se observaron en función del inóculo empleado, y la población en cuestión; comparada con la dilución serial en sus diferentes modalidades y la de crecimiento y aislamiento de colonias en medio sólido; permitió obtener clonas para los tres aislados sin mayor problema.

Por lo que respecta al comportamiento *in vivo* de las clonas obtenidas, es necesario remitirse a un análisis previo del comportamiento *in vivo* de los aislados. El comportamiento *in vivo* de los aislados, en general puede resumirse como "heterogéneo".

Los resultados obtenidos experimentalmente mostraron parasitemias considerablemente altas para los tres aislados, con similitudes en características y diferencias significativas para caracterizar el comportamiento particular *in vivo* de cada una de las poblaciones.

Es importante mencionar además, que las gráficas de las curvas de parasitemia para el comportamiento experimental *in vivo* de los aislados, no puede ser comparado directamente con la gráfica de las curvas del comportamiento *in vivo* de las clonas seleccionadas; ya que el comportamiento *in vivo* de los aislados se llevó a cabo mediante la infección en un modelo murino de *cepa* CD-1, la cual fue diferente a la BALB-C empleada en la determinación del comportamiento clonal. Sin embargo, incluso bajo estas condiciones los resultados obtenidos para cada una de las determinaciones *in vivo*, sirven como base para la observación y el análisis de uno y otro respectivamente.

Derivado de lo anterior, consideramos conveniente la realización de un experimento adicional con un modelo murino de la *cepa* BALB-C para la determinación del comportamiento *in vivo* de los aislados estudiados en fase de tripomastigote sanguíneo y en la fase de epimastigote.

Por lo que respecta al comportamiento clonal *in vivo*, los resultados nos lleva a inferir que podría existir "heterogeneidad intrapoblacional" en los aislados Acamilpa y Yucatán. En este aspecto, para el caso de Acamilpa se observó un comportamiento *in vivo* diferente de las clonas A.2 y A.3 con respecto a las clonas A.1 A.4 y A.5; por lo que se podría suponer la existencia de por lo menos dos clonas diferentes en el *aislado*. Complementariamente proponemos estudiar *in vitro* y a nivel molecular el comportamiento tanto de las clonas seleccionadas, como las restantes para una confirmación de los resultados.

No puede dejar de comentarse en este capítulo el caso particular de los resultados de *clonación* para el aislado Querétaro, el cual presentó el menor rendimiento de las tres poblaciones estudiadas. Este podría deberse a factores inherentes del *aislado*; ya que por sí mismas las clonas obtenidas presentaron desde el inicio del proyecto cierta dificultad para adaptarse *in vitro*.

Inicialmente, el periodo para la adaptación al medio de cultivo del **aislado** Querétaro fue mayor que para el caso de los otros dos aislados (hecho que fue una constante durante el desarrollo del estudio); como un dato adicional, es importante resaltar, que se ha observado experimentalmente que la histopatología del **aislado** Querétaro en ratones es muy elevada.

De esta manera, los resultados obtenidos con fines de **clonación**, consideramos que son la expresión de la supervivencia de las clonas resistentes y la delección de clonas virulentas susceptibles al manejo *in vitro*. No obstante que las parasitemias producidas por Querétaro sea semejantes en máximos de parasitemia o menores a las obtenidas con los otros aislados. Particularmente estudio se complementaría para este caso analizando el comportamiento *in vivo* e *in vitro* de las clonas del **aislado**; proponiendo a su vez que en éste se considere el establecimiento de un inóculo mayor al empleado en el experimento, a fin de que la probabilidad de colonias obtenidas sea mayor.

Para las clonas obtenidas a partir del **aislado** Yucatán, los resultados mostraron un resultado interesante que puso de manifiesto tres comportamientos *in vivo* diferentes. Por un lado, un comportamiento para la **clona** Y.2. diferente al presentado por Y.5, y otro muy semejante entre las clonas Y.3. y Y.4. (excluyendo a Y.1. por falta de datos); lo que lleva a pensar en la existencia de por lo menos tres clonas diferentes constituidas en un mismo **aislado**. También sugerimos el estudio a nivel molecular e *in vitro* de las clonas faltantes.

Finalmente, podemos concluir que los resultados obtenidos a lo largo del estudio conducen a pensar que los aislados mexicanos Acamilpa y Yucatán; biológicamente hablando, se encuentran probablemente formados por varias clonas, y creemos que la **virulencia** para cada uno de estos se encuentra en función de la **virulencia** de la **clona** predominante. Aquellas clonas que no

influyen en este comportamiento, pueden deletarse por inadaptación, o bien permanecer sin manifestación significativa dentro de la población

Adicionalmente, se podría pensar que la heterogeneidad en la manifestación de la variabilidad clínica podría estar influida también por el grado de **patogenicidad** de las clonas que conforman el **aislado**⁹.

VI. CONCLUSIONES

1. La técnica modificada de formación de colonias y crecimiento clonal en agar es una técnica estandarizada eficaz para la obtención de clonas a partir de aislados mexicanos de *T. cruzi*.
2. Se determinó la probable heterogeneidad intrapoblacional en los aislados Acamilpa y Yucatán, mediante el establecimiento del comportamiento *in vivo* de las clonas seleccionadas para este fin.
3. Los resultados obtenidos para las clonas en el presente estudio, no pueden considerarse determinantes y generalizados para la población total respectiva; se proponen como la base de estudios posteriores dirigidos.

BIBLIOGRAFIA

1. **Andrade, S., Andrade, V., Brodskin, C., Magalhaes, J., Barral Netto, M.** 1985. "Immunological response of Swiss mice infection with three different strains of Trypanosoma cruzi". Annals of tropical Medicine and Parasitology. 79: 397-407
2. **Bautista, N., Parra R.** 1987. "Extracción de antígenos metabólicos y somáticos de Trypanosoma cruzi de cuatro cepas mexicanas para las pruebas de fijación de complemento y hemaglutinación indirecta". UNAM. 67 pp.
3. **Bice, D. and Zeledon, R.** 1970. "Comparation of infectivity of strains of Trypanosoma cruzi" (Chagas 1909). J. Parasitol. 56: 663-670.
4. **Bongertz, V. and Dvorak, J.** 1983. "Trypanosoma cruzi: antigenic analysis of cloned stocks". Am. J. Trop. Med. Hyg. 32: 716-722.
5. **Brener.** 1973. "Biology of Trypanosoma cruzi"
6. **Budzco, D. and Kierszenbaum, F.** 1974. "Isolation of Trypanosoma cruzi from Blood". J. Parasitol. 60: 1037-1038.
7. **Doyle, P., Dvorak, J. and Engel J.** 1984. "Trypanosoma cruzi: Quantification and analysis of the infectivity of cloned stocks". J. Protozool. 31: 280-283.
8. **Dvorak, J.** 1984. "The natural heterogeneity of Trypanosoma cruzi: biological and medical implications". J. and Cel. Biochem. 24: 357-371.

9. **Fernandes, J. and Castellani, O.** 1966. "Growth Characteristics and Chemical Composition of Trypanosoma cruzi". Exp. Parasitol. 18: 195-202.
10. **Golberg, S. and Chiari, E.** 1980. "Growth and isolation of single colonies of Trypanosoma cruzi on solid medium". J. Parasitol. 66: 677-679.
11. **Gomes, M., Marques S., and Chiari, E.** 1991. "Trypanosoma cruzi: growth of clones on solid medium using culture and blood forms". Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 86: 131-132.
12. **Gutteridge, W.** 1981. "Trypanosoma cruzi: Recent biochemical advances". Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 75: 484-492.
13. **Herbert, W. and Lumsden W.** 1976. "Trypanosoma brucei: A Rapid "Matching" Method for Estimating the Host's Parasitemia". Exp. Parasitol. 40: 427-431.
14. **Hyde, J.** 1993. "Culturing and Biological Cloning of Trypanosoma cruzi". Methods in molecular Biology. Vol. 21: Protocols in molecular Parasitology, 15-28.
15. **Katzin, A., Lajmanovich S. and González, S.** 1977. "Comparative stability of epimastigotes and trypomastigotes in different wash solutions". J. Parasitol. 63: 925-927.
16. **Lanham, S.** 1968. "Separation of Trypanosomes from the Blood of Infected Rats and Mice by Anion exchangers". Nature. 218: 1273-1274.
17. **Lanham, S. and Godfrey, D.** 1970. "Isolation of salivarian Trypanosomes from Man and other Mammals using DEAE-Cellulose". Exp. Parasitol. 28: 521-534.

18. **Levine, N. et al.** 1980. "A newly revised clasification of the protozoa". J. Protozool. 27: 37-58.
19. **Lima, M., Jansen, A., Rondinelli, E. and Gattass, C.** 1990. "Trypanosoma cruzi. Properties of a clone isolated from CL strain". Parasitol. Res. 77: 77-81.
20. **Melo, R. and Brener, Z.** 1978. "Tissue tropism of different Trypanosoma cruzi strains". J. Parasitol. 64: 475-482.
21. **Memorias del curso-taller sobre la Enfermedad de Chagas.** 1994. Reunión Nacional sobre la Enfermedad de Chagas, Puebla Méx.
22. **Mercado, T. and Katusha, K.** 1979. "Isolation of Trypanosoma cruzi from the blood of infected mice by column chromatography". Preparative Biochemistry, 9: 97-106
23. **Morel, C, Chiari, E., Camargo E., Mattei, D., Romanha, A. and 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. 77: 6810-6814
24. **OMS.** 1991. "Control de la Enfermedad de Chagas Informe de un comité de expertos de la OMS". Serie Informes técnicos. 811: 101pp.
25. **Postan, M., Dvorak, J., and Mc Daniel, J.** 1983. "Studies of Trypanosoma cruzi clones in inbred mice. I- A compararision of the course of infection of C3H/HEN mice with two clones isolated from a common source". 1983. Am. J.Trop. Med. Hyg. 32: 497-506

26. **Rodríguez, P.** Manual ilustrado de Parasitología Médica. 1ª ed. México, Ed. Cuéllar, 1991, 190 pp.
27. **Romero, R.** Microbiología y Parasitología Humana. Bases etiológicas de las Enfermedades Infecciosas. 1ª ed. México, Ed. Panamericana. 1993, 750pp.
28. **Tay, J., Salazar P., Ontiveros, D.** 1969. "El comportamiento en el ratón blanco de una cepa de Trypanosoma cruzi mediante pases sucesivos en diferentes especies de triatomas". Rev. Latinoamericana de Microbiol. Parasitol 11 79-89
29. **Tay, J. y cols.** 1980. "La Enfermedad de Chagas en la República Mexicana". Salud Pública de México. XII: 409-450.
30. **Tay, J., Gutierrez-Q., M., Salazar, P., Castillo, M., Ortega, M.** 1973. "Estudios sobre seis cepas mexicanas de Trypanosoma cruzi". Re. Inv. Salud Pública. 33: 67-76.
31. **Thompson, R. and Lymbery, A.** 1990. "Intraspecific Variation in parasites- What is a strain?". Parasitology Today. 6: 345-348.
32. **Tortora, G. y Anagnostakos, N.** Principios de Anatomía y Fisiología Humana. 5ª. ed. México, Ed. Harla, 1989, 943pp.
33. **Tybayrene, M. and Ayala, F.** 1991. "Towards a population genetics of microorganisms: The clonal Theory of parasitic protozoa". Parasitol. Today. 7: 228-232.
34. **Velasco, O. y cols.** 1991. "La Enfermedad de Chagas. Una revisión histórica suscita y parcial de lo que ocurre en México y en el mundo". Secretaría de Salud. Publicación técnica del INDRE 8: 1-56.
-

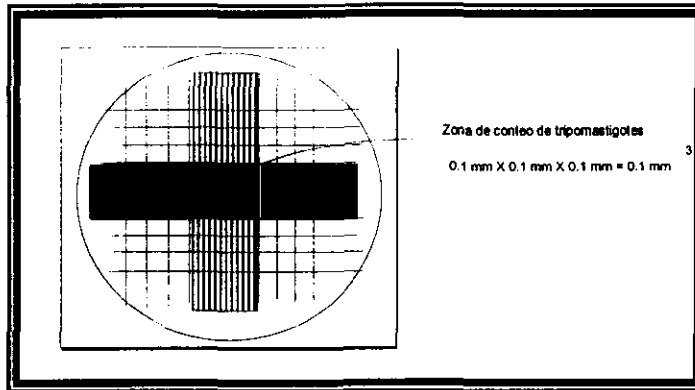
35. **Villalta, F. and Kierszenbaum, F.** 1987. "Insect-borne and culture-derived metacyclic Tripanosoma cruzi: differences in infectivity and virulence". Am. J. Trop. Med. Hyg., 36: 529-532.
36. **Wittner, M., Squillante, L., Nadler, J. and Tanowitz, H.** 1982. "Trypanosoma cruzi: Colony formation and clonal growth in agar". Exp. Parasitol. 53: 255-261.
37. **World Health Organization.** 1991. "Tropical diseases: progress in research 1989-1990". 10 th TDR. Programme report.

APENDICE A

TECNICAS Y PROCEDIMIENTOS

INFECCION DE T. cruzi A UN MODELO MURINO Y DETERMINACION DE LA CURVA DE PARASITEMIA

1. Formar lotes de ratones para cada aislado, stock, clona o cepa
2. Determinar el inóculo con base en el conteo de tripomastigotes sanguíneos
 - a) Tomar un ratón infectado e identificarlo
 - b) Tomar por la cola al ratón y colocarlo en una rejilla para facilitar su manejo
 - c) Desinfectar la cola del ratón con un algodón con alcohol etílico al 70%
 - d) Con unas tijeras de disección limpias hacer un corte transversal a la punta de la cola del ratón y estimular la salida de aproximadamente 10µl de sangre
 - e) Limpiar la cola del ratón con un algodón limpio, ejerciendo presión para detener la salida de sangre
 - f) Tomar 10 µl de la muestra con una micropipeta y depositarla en un pozo de una placa de ELISA que se encuentra con 90µl de PBS con el fin de diluir la muestra y facilitar el conteo de tripomastigotes. Mezclar perfectamente la muestra y tomar una alícuota de 10 µl para depositarla en el hemocitómetro
 - g) Reposar la muestra en el hemocitómetro unos segundos para que se asiente la preparación
 - h) Observar al microscopio óptico y realizar el conteo de tripomastigotes viables en la zona central del hemocitómetro y registrarla



- i) Calcular el número de tripomastigotes por mililitro de sangre a partir del número de tripanosomas contados considerando el factor de dilución y, el volumen de la muestra dado el caso
- j) Realizar las diluciones convenientes hasta obtener una concentración final de 1×10^6 tripanosomas
- k) Inocular la dosis en un volumen de preferencia no mayor a 0.3 ml.
Mantener ratón control
3. Seguir el curso de la infección de los aislados mediante la cuantificación de tripomastigotes sanguíneos por mililitro de sangre para cada uno de los ratones del lote durante 45 días o bien hasta la muerte ocasionada por la infección. Realizar la revisión cada tercer día
4. Registrar el número de tripomastigotes por mililitro de sangre por ratón para cada uno de los días de revisión en una tabla y realizar una gráfica de concentración de tripomastigotes/ml de sangre vs días postinfección

ESTANDARIZACION DE LA TECNICA DE CONTEO PARA PARASITEMIAS MENORES A 1×10^6 TRIPOMASTIGOTES/ mL DE SANGRE

- **DESARROLLO DE LA TECNICA**

- 1) Sangrar por la cola del ratón 4,5 gotas
- 2) Tomar 10 L de sangre con micropipeta y pasar a un portaobjetos
- 3) Cubrir los 10 L de sangre totalmente con un cubreobjeto de 22*22 mm.
- 4) Contar 50 campos verticalmente la siguiente forma:

10 campos orilla izquierda
10 campos entre orilla izquierda y centro
10 campos en el centro
10 campos entre orilla derecha y centro
10 campos orilla derecha
total 50 campos

- **CONTEO DEL NUMERO TOTAL DE CAMPOS EN EL CUBREOBJETO DE 22X22 mm.**

| Persona | campos contados | sumatoria | Promedio de sumatorias |
|---------|-----------------|-----------|------------------------|
| A | 1870 | 6192 | |
| | 2018 | X= 2064 | |
| | 2304 | | |
| b | 2304 | 6385 | 2096 campos |
| | 2401 | x= 2128 | |
| | 1680 | | |

- CALCULO PARA LA OBTENCION DE TRIPOMASTIGOTES / mL DE SANGRE

Si se considera:

a = tripomastigotes contados en 50 campos

b= promedio de las sumatorias del número total de campos contados dividido entre 50

$$= (2096 / 50)$$

c= tripomastigotes en 10 μ L de sangre

entonces : **a x b = c**

Si **c** es multiplicado por 100 el resultado obtenido expresa la cantidad de tripomastigotes contenidos en 1,000 microlitros, es decir en un mililitro de sangre.

Por lo tanto; si sustituimos el resultado de **cx100** como **d**, entonces la fórmula para el cálculo de tripomastigotes por mililitro de sangre se expresaría de la siguiente manera:

$$d = (a \times b)$$

$$d = (a \times 4192)$$

Donde el 4192 obtenido se considera como **factor de conversión**, siempre y cuando se utilice un cubreobjeto de 22x22mm.

$$d = (a \times \text{factor de conversión})$$

sustituyendo,

| |
|---|
| $\text{tripomastigotes/ ml de sangre} = \frac{\text{tripomastigotes contados en 50 campos} \times \text{factor de conversión}}{50}$ |
|---|

• **COMPARACION DE LA TECNICA ESTANDARIZADA VS HEMOCITOMETRO**

Lecturas obtenidas en hemocitómetro:

| persona | tripomastigotes contados | factor de dilución utilizado | cálculo de tripomastigotes/ ml de sangre |
|---------------------|--------------------------|------------------------------|--|
| a | 20 | 100 | 2.0 E 7 |
| b | 19 | 100 | 1.7 E 7 |
| promedio obtenido = | | | 1.95 E7 tripomastigotes / ml de sangre |

Lecturas obtenidas en cubreobjeto:

| persona | Tripomastigotes contados | dil. | factor de conv. X tripomastigotes contados X dilución | tripomastigotes/ml de sangre |
|---------------------|--------------------------|--------|---|------------------------------|
| a | 100 | 1: 100 | 2096 x 100 x 10 | 2.09E 7 |
| b | 90 | 1: 100 | 2096x 9 x 100 | 1.88 E7 |
| promedio obtenido = | | | | 1.98 E7 |

Comparación:

| técnica | tripomastigotes/ ml de sangre | error relativo |
|---------------|-------------------------------|--|
| portaobjetos | 1.98 E7 | (técnica en hemocitómetro-técnica en portaobjetos/ técnica en hemocitómetro) x 100) = 1.53 % |
| Hemocitómetro | 1.95 E7 | |

Nota: se empleó un ratón CD1 infectado con el aislado Yucatán para el experimento.

Por lo tanto, la técnica estandarizada para el conteo de tripomastigotes en parasitemias menores a 1×10^6 tripomastigotes por mililitro de sangre a emplear es técnicamente aceptable.

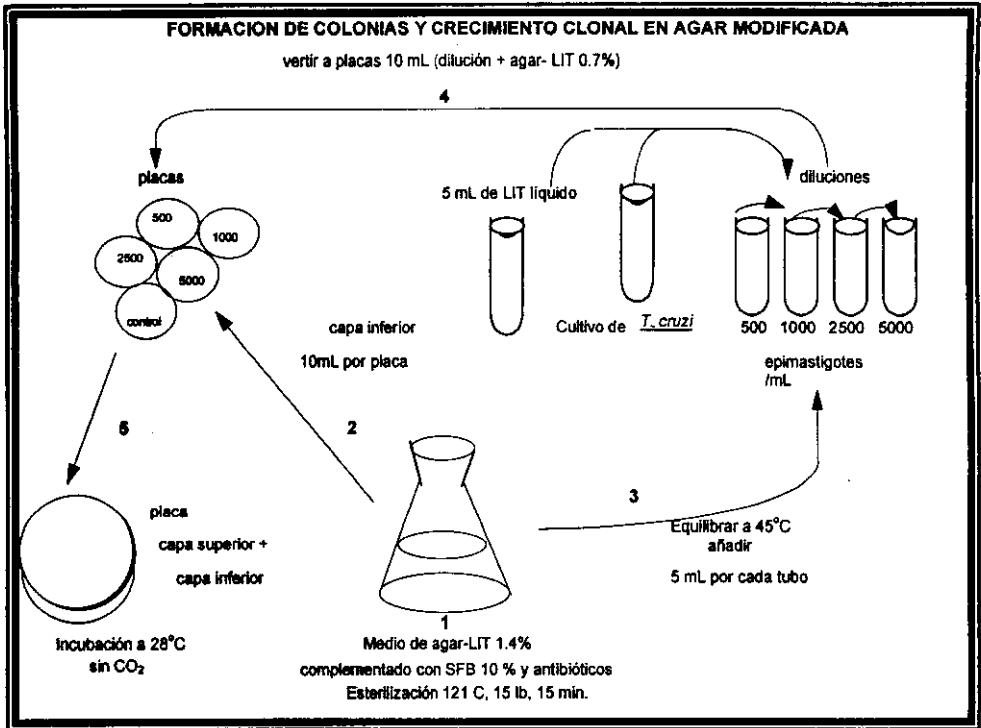
PURIFICACION DE TRIPOMASTIGOTES SANGUINEOS

1. Esterilizar campana de flujo laminar
2. Marcar 3 tubos de fondo cónico estériles de 15 ml (uno para cada aislado, cepa, stock o clona) y agregar heparina como anticoagulante y mantenerlos en condiciones de esterilidad
3. Preparar tres tubos de fondo cónico y marcarlos. Agregar 3 ml de Ficoll-Hypaque y mantenerlos en condiciones estériles
4. Cuantificar la concentración de tripomastigotes por mililitro de sangre en hemocitómetro para dos ratones infectados con la población en estudio que se encuentren en parasitemia alta
5. Mediante la técnica de punción cardiaca extraer 3 ml de sangre de los ratones infectados seleccionados.
 - a) Adormecer al ratón en una cámara de éter aproximadamente por 30 segundos
 - a) Colocar al ratón en una base y limpiar el abdomen de éste con un algodón con alcohol etílico al 70%.
 - b) Introducir la aguja de una jeringa hipodérmica desechable estéril de 1 mL debajo de las costillas del ratón, de tal forma que se llegue al corazón por la parte inferior y succionar el émbolo hasta la obtención del mayor volumen de sangre
 - d) Sacrificar al ratón por desnucamiento
 - c) Tapar la jeringa y mantener la muestra en condiciones de esterilidad, trasladar la muestra a la campana e incorporarla al tubo de fondo cónico con heparina correspondiente. Agitar suavemente para lograr la incorporación del anticoagulante
6. Medir el volumen total de sangre obtenida
7. Con pipeta pasteur estéril tomar cada una de las muestras y depositarlas en el tubo conteniendo Ficoll-Hypaque correspondiente, resbalando la muestra siempre por las paredes y cuidando no romper el gradiente

8. Centrifugar las muestras bajo refrigeración en rotor horizontal a una velocidad de 1500 rpm a 20°C durante 45 minutos sin freno
9. Sacar las muestras de la centrifuga y bajo condiciones de esterilidad obtener la capa correspondiente a los linfocitos y resuspenderla en 1 mL de PBS-albúmina
10. Realizar por lo menos 2 lavados con PBS-albúmina para evitar algunos efectos tóxicos del Ficoll-Hypaque en los parásitos
11. Resuspender el botón obtenido en 3 mL de medio de LITc e incubar en botellas de cultivo a 28° C, sin atmósfera de CO₂ y condiciones de humedad

TECNICA DE CLONACION DE T. cruzi MEDIANTE FORMACION DE COLONIAS Y CRECIMIENTO CLONAL EN AGAR MODIFICADA

1. Preparación del medio de cultivo agar-LIT. Se prepara el medio de cultivo LIT como se menciona en el apéndice II y al momento de esterilizar adicionar la cantidad necesaria de agar DIFCO para obtener una concentración final de 1.4% (1.4 g en 100 mL de medio de LIT)
2. Esterilizar a 121°C, 15 lb de presión durante 15 minutos
3. Esterilizar campana de flujo laminar, preparar las placas e identificarlas
4. Separar el medio LIT que se utilizará como base y complementarlo con suero fetal bovino y antibióticos para incorporarlo a las placas (10 mL por placa)
5. Equilibrar el medio LIT restante a 45°C
6. Realizar las diluciones necesarias con medio de LITc líquido para obtener 500, 1000, 2500 y 5000 epimastigotes por cada 10 mL de agar-LITc
7. Complementar el medio restante para la capa superior
8. Incorporar la suspensión de epimastigotes con el medio agar-LITc y homogeneizar perfectamente la mezcla
9. Verter la mezcla a la base de agar-LITc correspondiente evitando formar burbujas
10. Dejar solidificar el medio e incubar las placas en forma invertida a 28°C, en ambiente de humedad hasta la aparición de colonias visibles.



AISLAMIENTO DE CLONAS

1. Esterilizar la campana de flujo laminar
2. Observar el crecimiento en las placas y escoger las colonias más separadas a fin de evitar la contaminación con alguna otra colonia adyacente; marcar por la parte inferior de la caja con un plumón la colonia seleccionada
3. Encender el mechero de Bunsen y preparar un vaso con alcohol etílico para flamear y esterilizar el bisturí.
4. Preparar y marcar las botellas de cultivo a utilizar para la propagación y mantenimiento de las clonas
5. Realizar un corte en cuadro de la colonia para aislamiento e incorporarla a la botella de cultivo correspondiente con 3 ml de medio de LITc líquido equilibrado previamente a 28°C. Realizar este mismo paso para las colonias seleccionadas
6. Incubar a 28°C en condiciones de humedad

CRIOPRESERVACION DE CLONAS DE T. cruzi

1. Pasar los cultivos de T. cruzi a un tubo de 15 ml de fondo cónico
2. Centrifugar a 1500 rpm durante 10 minutos a temperatura ambiente en centrífuga refrigerada con rotor horizontal sin freno
3. Retirar el sobrenadante obtenido de los tubos de fondo cónico
4. Enfriar los botones obtenidos en una cama de hielo durante 3 minutos
5. Etiquetar crioviales de 1mL con las clonas correspondientes
6. Resuspender los botones obtenidos para cada clona en una mezcla formada por suero fetal bovino, DMSO y glicerina en una proporción de 90:10:10. Vaciar en los crioviales correspondientes hasta alcanzar un volúmen no mayor a 0.7 mL para cada criovial
7. Acomodar los crioviales en una caja de unicel con paredes de 1cm de grueso aproximadamente y congelar durante 24 horas a una temperatura de -70°C
8. Después de este periodo mantener en congelación en nitrógeno líquido hasta su uso

Nota: Para su descongelamiento el proceso debe ser en sentido inverso

APENDICE B

MEDIOS DE CULTIVO Y SOLUCIONES

MEDIO DE LIT

Para 1000 mL de medio de cultivo:

| Sustancia | Cantidad |
|---|------------|
| 1. Cloruro de sodio | 4.0 g |
| 2. Cloruro de potasio | 0.4 g |
| 3. Fosfato disódico anhidro | 8.0 g |
| 4. Glucosa | 2.0 g |
| 5. Triptosa | 5.0 g |
| 6. LIB (liver infusion broth) | 5.0 g |
| 7. Hemina | 25.0 mg |
| 8. FCS (fetal cow serum) | 100.0 mL |
| 9. Antibióticos penicilina-estreptomicina | (opcional) |
| 100 mil unidades y 100 mil µg por litro. | |

- a) Después de pesadas las sustancias, se colocan en un matraz erlenmeyer, enseguida se agregan 895 ml de agua destilada y se agita hasta disolución
- b) La solución así obtenida se esteriliza durante 15 minutos a 15 libras de presión con previo ajuste del pH a 7.2. Esta solución puede hacerse en cantidades mayores y mantenerse en refrigeración a 4°C hasta el momento de su uso
- c) Se agregan 100 mL de FCS descomplementado, 5.0 ml de solución de trabajo de hemina estéril a una concentración de 5 mg/mL y antibióticos penicilina-estreptomicina (para inactivar el suero se tiene que calentar a 68°C por 60 minutos ó a 56°C por 30 minutos)

Recomendaciones. El medio de LIT con suero y hemina se mantiene viable durante un mes, mientras que el medio de LIT sin complementar dura 3 meses (ambos en refrigeración). El medio de LIT es fotosensible por lo que debe estar almacenado en obscuridad. La solución de trabajo de hemina se mantiene en refrigeración durante 6 meses en refrigeración y el suero debe mantenerse congelado preferiblemente inactivo.

Solución de trabajo de Hemina. Se pesan 500 mg de hemina y se colocan en un matraz aforado de 100 ml, se agregan 50 ml de trietanolamina y se aforan a 100 ml con agua destilada.

Nota: Si no se tiene trietanolamina se pueden agregar 50 mL de KOH, se disuelve y se afora a 100 mL, se obtienen los mismos resultados.

MEDIO DMEM

Para 1000 mL de medio de cultivo:

| Sustancia | Cantidad |
|---|-----------------|
| 1) Medio DMEM | 1 sobre |
| 2) Agua calidad Megapura | 1L |
| 3) Carbonato de sodio monobásico (para cultivo de células) | 3.7 g |

a) Ajustar a pH 7.2 con ácido clorhídrico

b) Esterilizar por filtración utilizando gas N₂ de presión.

c) Agregar aminoácido no esenciales en una concentración 10⁻⁴ M

MEDIO RPMI

Para 1000 mL de medio de cultivo:

| Sustancia | Cantidad |
|----------------------------------|-----------------|
| 1) Medio RPMI | 1 sobre |
| 2) Agua calidad Megapura | 1 L |
| 3) Carbonato de sodio monobásico | 2 g |

El pH obtenido al disolver los componentes no se aleja del pH neutro, por lo que únicamente se filtra para su esterilización utilizando gas N₂ de presión

PBS pH 7.2

SOLUCIONES MADRE

- a) Solución de fosfato disódico monohidrogenado (0.15M Na₂ HPO₄)

| Sustancia | Cantidad |
|-------------------------------------|----------|
| 1. Na ₂ HPO ₄ | 21.3g |
| 2. Agua destilada | 1L |

- b) Solución de fosfato de potasio dihidrogenado (0.15M KH₂PO₄)

| Sustancia | Cantidad |
|------------------------------------|----------|
| 1. KH ₂ PO ₄ | 20.4g |
| 2. Agua destilada | 1L |

- c) Solución de cloruro de sodio (0.15M NaCl)

| Sustancia | Cantidad |
|-------------------|----------|
| 1. NaCl | 8.8g |
| 2. Agua destilada | 1L |

A partir de las soluciones madre considerar los siguientes volúmenes para su incorporación

| | |
|-----------------------------------|--------|
| a) Solución de fosfato de sodio | 76 mL |
| b) Solución de fosfato de potasio | 24 mL |
| c) Solución de cloruro de sodio | 100 mL |
| Agua | |

Después de incorporados los ingredientes se esteriliza por autoclave durante 15 minutos a 15 libras de presión.

Nota: Para el caso de requerir **PBS- albúmina** se realizan los mismos pasos y se incorpora albúmina al 4%. La albúmina se agrega poco a poco hasta su disolución total evitando la formación de burbujas durante el proceso.

PSG pH 8.0

Para 1000 mL de solución

| Sustancia | Cantidad |
|-------------------------------------|-----------------|
| 1. Fosfato de sodio monohidrogenado | 0.78 g |
| 2. Fosfato de sodio dihidrogenado | 13.48 g |
| 3. Cloruro de sodio | 4.25 g |
| 4. Glucosa | 5.0 g |
| 5. Agua bidestilada | 1.0 L |

Disolver y ajustar el pH. Aforar a 1000 mL y esterilizar por filtración

GLOSARIO

adenopatía Padecimiento de los ganglios linfáticos.

aislado Población de organismos de T. cruzi obtenida a partir de un huésped, ya sea el vertebrado o el transmisor; la cual es reproducida en su totalidad en un modelo experimental in vitro o in vivo.

artralgia Neuralgia o dolor de una articulación.

astenia Falta ó pérdida de fuerza.

Biodemo Estudios de poblaciones biológicas de T. cruzi y su correlación patógena en modelos experimentales para su caracterización fenotípica.

cardiocyte Células que conforman el corazón.

cardiomegalia Aumento de volúmen del corazón.

cardiopatía chagásica crónica Enfermedad del corazón. Es la forma que hace trascendente a la Enfermedad de Chagas; el cuadro clínico varía considerablemente de acuerdo al grado de insuficiencia cardiaca o al tipo de alteración del ritmo. Los síntomas más comunes son las palpitaciones y la disnea, menos frecuentes los estados vertiginosos y otros sincopales, precordalgias y síntomas originados por la estásis visceral particularmente hepática.

cefalea Dolor de cabeza, cefalalgia.

cepa conjunto de organismos obtenidos posee una ascendencia conocida, es decir que posee una combinación de características biológicas y/o genéticas bien definidas experimentalmente.

citopático Efecto de daño a las células.

clona Población proveniente de una sólo célula. Posee la misma constitución genética que la primera y sus características son transferibles a su descendencia; excepto cuando ocurre mutación entre ellas.

clonación Mecanismo mediante el cual se genera la reproducción de una especie a partir de un sólo organismo, incluyendo características genéticas.

disnea Respiración difícil.

endemia Ocurrencia habitual de una enfermedad o de un agente infeccioso dentro de una zona geográfica.

esquizodemo Análisis del ADN del cinetoplasto de T. cruzi para su caracterización genotípica.

estasis Disminución del flujo sanguíneo.

hemaglutinación indirecta Prueba de diagnóstico inmunoquímico de tipo indirecto basada en la reacción antígeno anticuerpo, donde se verifica la presencia de anticuerpos de tipo IgG, como consecuencia de la exposición a un antígeno ; en este caso el antígeno es adherido a glóbulos rojos de tipo "o" y se lleva a cabo una precipitación.

Hepatoesplenomegalia Hígado y bazo aumentan intensamente su volumen.

hiporexia Falta o disminución de oxígeno.

histopatología Padecimiento donde los agentes parasitarios se localizan en tejidos y sangre.

histotropismo Respuesta a un estímulo dado para moverse en una dirección dada.

huésped Organismo capaz de albergar en su interior a un parásito, que vive a expensas; puede ser intermediario o definitivo. Es definitivo cuando en aquel organismo infectado el parásito adquiere madurez sexual.

infectividad Capacidad de un organismo para establecer una infección.

isquemia Disminución del aporte de oxígeno que debilita las células de algún tejido, pero no su muerte.

linfadenitis Hipertrofia, sensibilidad anormal e inflamación de los ganglios.

megacolón Aumento del volumen del colon causado por la destrucción del plexo mesentérico.

megaesófago Aumento del volumen del esofago.

megaviscera Aumento del tamaño de una víscera.

meningoencefalitis Padecimiento con localización predominante en el SNC se caracteriza por fiebre alta (en los lactantes hay hipotermia), cefalea intensa rigidez de músculos de la nuca, vómito en proyectil, hiperreflexia y convulsión.

mialgia Dolor muscular.

miastenia Debilidad de los músculos.

miocarditis Inflamación del músculo cardíaco.

miocitólisis Lisis celular del corazón.

morbilidad Proporción de enfermos en lugar y tiempo determinados.

mortalidad Cantidad proporcional de defunciones correspondiente a población o tiempo determinados.

parásito Organismo que vive a expensas de otro causándole daño. Puede ser facultativo obligado o accidental.

patogénesis Origen de una enfermedad.

patogenicidad Capacidad de un organismo para infectar un organismo, manifestar una enfermedad y causar daño a un huésped susceptible.

patrón antigénico Comportamiento de respuesta inmunológica de una población de T. cruzi determinado básicamente por la presencia de determinantes antigénicos característicos de la población, ya sean glicoproteínas de superficie del parásito ó fracciones subcelulares.

peptinodemo Análisis de la constitución proteica de una población de T. cruzi para su caracterización a nivel molecular.

Protozooario Animal microscópico unicelular que posee una gran variedad de formas y tamaños. Ciertos componentes internos llamados organelos son comunes para todos ellos . Por ejemplo, el núcleo contiene el material genético y está limitado por una membrana nuclear. El citoplasma está encargado de la obtención de los alimentos, la descarga de material de desecho, protección al organismo en sí y por último movimiento. El endoplasma es la porción más interna y condensada, ahí se encuentran las mitocondrias, el Aparato de Golgi, el Retículo endotelial, así como partículas alimenticias tales como proteínas y glucogeno.

reservorio Organismo capaz de mantener vivo a un parásito aunque no le produzca daño y mantiene la enfermedad en la naturaleza.

Seroprevalencia Predominio del número de casos con diagnóstico de presencia de anticuerpos para un agente infeccioso o algún padecimiento.

Signo de Romaña Complejo oftalmo ganglionar que consiste en una blefaritis indolora, bipalpebral, unilateral, eritemopapulosa, con edema elástico, con reacción conjuntival y ganglionar satélite.

stock población la cual aún cuando se ha mantenido experimentalmente por largos periodos no se encuentra totalmente bien definida su caracterización o bien se conoce parcialmente.

toxina Mecanismo de daño específico de un organismo patógeno que consiste en la formación de sustancias. Pueden clasificarse en endotoxinas y exotoxinas.

transmisor Huésped que interviene antes del huésped definitivo en el ciclo de vida de ciertos parásitos; comúnmente artrópodos. Existen aquellos que son mecánicos que sólo transportan con sus patas y biológicos cuando el parásito se multiplica o continua su ciclo biológico.

triatómino Insecto hematófago (chinche) transmisor de la Enfermedad de Chagas, se le conoce también como chinche besucona u hocicona.

tromboembolismo Coagulación de un vaso sanguíneo no roto con la consecuente obstrucción e interrupción de la circulación.

virulencia Capacidad mayor o menor de patogenicidad de un organismo.

visceromegalia Ver megaviscera.

Zimodemo Estudio de la constitución izoenzimática de una población de T. cruzi para el establecimiento de su caracterización molecular.