

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS Y FARMACIA

CARACTERIZACIÓN DE DIEZ CEPAS DE *Trypanosoma cruzi*
POR CURVAS DE CRECIMIENTO EN CULTIVO *in vitro*

Informe de Tesis

Presentado por

DINA ARACELY CRUZ MERIDA

Para optar al título de

QUIMICO BIOLOGO

Guatemala, febrero de 1997

PROPIEDAD DE LA UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
Biblioteca Central

06

T(1745)

C.4

**JUNTA DIRECTIVA DE LA
FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS Y FARMACIA**

<i>DECANO</i>	LIC. JORGE RODOLFO PEREZ FOLGAR
<i>SECRETARIO</i>	LIC. OSCAR FEDERICO NAVE HERRERA
<i>VOCAL I</i>	LIC. MIGUEL ANGEL HERRERA GALVEZ
<i>VOCAL II</i>	LIC. GERARDO LEONEL ARROYO CATALAN
<i>VOCAL III</i>	LIC. RODRIGO HERRERA SAN JOSE
<i>VOCAL IV</i>	BR. ANA MARIA RODAS CARDONA
<i>VOCAL V</i>	BR. HAYRO OSWALDO GARCIA GARCIA



DEDICO ESTE ACTO

A Mi Madre, Regina, por todo tu amor, ejemplo, cuidado y dedicación a mi, siempre estas en mi mente y corazón.

CON ESPECIAL AGRADECIMIENTO

- A : mi asesora Licda. Vivian Matta Rios por su asesoría y apoyo.
- A: la Misión Japonesa de ayuda internacional (JICA) en Guatemala por el financiamiento del presente trabajo.
- A: Al personal del Departamento de Citohistología por su valiosa colaboración.
- A : el departamento de Informatica por su valiosos conocimientos.
- A : los revisores de éste trabajo por su disponibilidad y tanta profesionalidad.
- A: el Dr. Tetsuo Yanagi por su valiosa colaboración
- A: Edwin por ser la persona quien mas alientos me dió, por su gran ayuda en la realización de éste escrito, por su amor y sus oraciones.
- A : mi padre por ser mi gran amigo y por su apoyo en todo momento.
- A : mi hermana y mejor amiga , Claudia, y a mi hermano Marvin.
- A : la familia Gudiel Arriaga por sus palabras, amistad y apoyo.
- A tantas personas que han aportado su granito de arena
- A : ti Señor que aunque figures como el último sabes bien que eres el primero a ti que siendo Dios te hiciste hombre, que siendo rico te hiciste pobre, Señor verte a ti y mirarte cara a cara será la realización máxima de todos los sueños que jamas he sentido, mientras llega ese momento permíteme conocerte cada día y recibe mi gratitud y adoración.

INDICE

	No. Página
I. RESUMEN	1
II. INTRODUCCIÓN	3
III. ANTECEDENTES	5
A. Morfología de <i>T. cruzi</i>	5
B. Ciclo Vital	6
C. Aislamiento y Criterio de Identificación	8
D. Caracterización	8
1. Caracterización inmunológica	10
2. Caracterización bioquímica	11
a. Caracterización por zimodemos	12
b. Caracterización por esquizodemos	13
c. Caracterización por huellas digitales	13
3. Caracterización por curvas de parasitemia	15
4. Caracterización por generación	19
5. Combinación de métodos de caracterización	20
6. Caracterización por polimorfismo genético	21
IV. JUSTIFICACIONES	23
V. OBJETIVOS	24
VI. HIPOTESIS	25
VII. MATERIALES Y METODOS	26
VIII. RESULTADOS	32
IX. DISCUSION DE RESULTADOS	34
X. CONCLUSIONES	38
XI. RECOMENDACIONES	39
XII. REFERENCIAS	40
XIII. ANEXOS	44

I. RESUMEN

La enfermedad de Chagas representa un serio problema de salud en aproximadamente 18 ciudades de América. En muchas otras, aunque el vector está presente y el parásito ha sido aislado de reservorios animales, las infecciones humanas han sido reportadas esporádicamente (1).

En relación al parásito, *Trypanosoma cruzi* pertenece a una población heterogénea, compuesta por un pool de cepas que circula tanto en el ciclo doméstico como en el ciclo selvático, involucrando a humanos, vectores y animales reservorios del parásito, su aislamiento y estudio han demostrado la presencia de un gran rango de cepas con distintas características. Hasta el momento no hay estudios publicados de caracterización por curvas de crecimiento de parásitos en cultivo *in vitro* con aislamientos guatemaltecos. Sin embargo los resultados de estudios de caracterización por curvas *in vivo* informados por Rodas y Monroy (1987,1994) realizados con aislamientos guatemaltecos presentan que las cepas de *T. cruzi* muestran heterogeneidad en su comportamiento.

Por lo que el propósito del presente trabajo es contribuir al estudio y caracterización de ocho aislamientos guatemaltecos de *Trypanosoma cruzi*, mediante curvas de crecimiento en cultivo *in vitro*, incluyendo en el estudio dos cepas nominales como controles, la Y y la Tulahuen.

Siguiendo el diseño experimental se realizaron siete repeticiones para cada uno de los aislamientos, efectuando los recuentos durante un período de 21 días. A partir de los resultados obtenidos se plotearon las curvas de concentración de parásitos y se analizaron los parámetros de concentración de parásitos, velocidad de crecimiento expresada como area bajo la curva y día pico de mayor concentración. Se realizaron comparaciones de los aislamientos respecto a los controles y a cada uno de los aislamientos.

Existieron diferencias significativas entre los distintos aislamientos respecto a la concentración de parásitos y la velocidad de crecimiento. El aislamiento SMIS-01 aislada de un individuo con la enfermedad en su fase aguda, presentó la mayor concentración de parásitos (4.89×10^8 parásitos /ml) y un aislamiento proveniente del insecto *T. dimidiata* presentó la menor concentración de parásitos (2.91×10^8 parásitos/ml). Las concentraciones de las cepas control se encuentran en valores intermedios. Respecto a la velocidad de crecimiento, reaparece el aislamiento de humano SMIS-01 presentando la mayor velocidad de crecimiento respecto a todos los demás (Area Bajo la Curva de crecimiento de parásitos vrs tiempo: $ABC = 64.3 \times 10^4$). En el grupo de los aislamientos de humano, SMIS-07 aislado de una infante con signos clinicos de la enfermedad de chagas en fase aguda, presentó la menor velocidad de crecimiento ($ABC = 42.4 \times 10^4$). Ambos aislamientos presentaron mayor velocidad de crecimiento respecto a las dos cepas control.

Entre el grupo de los aislamientos provenientes de *T. dimidiata* capturadas en Santa María Ixhuatán, el aislamiento DD16 presentó la mayor velocidad de crecimiento ($ABC = 46.2 \times 10^4$) y el aislamiento DD15 presentó la menor velocidad de crecimiento ($ABC = 31.7 \times 10^4$). Los dos aislamientos presentaron mayor velocidad de crecimiento respecto a la cepa control Y ($ABC = 31.2 \times 10^4$) y solamente DD16 presentó mayor velocidad de crecimiento frente a la cepa control Tulahuen ($ABC = 42.1 \times 10^4$). En el grupo de aislamientos provenientes de humano todos presentaron mayor velocidad de crecimiento respecto a los demás aislamientos y respecto a las dos cepas control, mientras que en el grupo de aislamientos provenientes de triatomíneos todos presentaron mayor velocidad frente a la cepa control Y y solamente dos de ellos presentaron mayor velocidad respecto a la cepa control Tulahuen.

Se realizó un análisis morfométrico de los aislamientos midiendo los parásitos con una escala micrométrica de un ocular calibrado para el objetivo de inmersión. La longitud varió entre $21.54 - 30.56 \mu$; las diferencias de longitud entre los aislamientos es estadísticamente significativa ($p < 0.05$). El ancho del parásito de los distintos aislamientos no muestran diferencias estadísticamente significativas.

Por medio de éste estudio se puede concluir que los diferentes aislamientos de *T. cruzi* muestran heterogeneidad en su comportamiento con respecto a su capacidad de multiplicación y velocidad de crecimiento, así como en su morfología. Los parámetros de caracterización analizados en el presente estudio representan un instrumento de diferenciación y comparación de los aislamientos de *T. cruzi*.

II. INTRODUCCIÓN

La enfermedad de Chagas es una amenaza permanente para al menos un cuarto de la población de América Latina. Las manifestaciones clínicas y características epidemiológicas son altamente variables de un área endémica a otra y existe una amplia variedad en los rangos de prevalencia, modos de transmisión, características del parásito, patología clínica, vector y hospedero reservorio. Es una enfermedad que depende relativamente del desarrollo social y económico de los individuos ya que la chinche triatomina y la enfermedad se transmiten cuando este insecto transmisor permanece por largo tiempo en viviendas pobres, construidas con adobe y con techos de bajareque (1).

El agente etiológico de esta tripanosomiasis americana, es el protozoo flagelado *Trypanosoma cruzi*, que fue descubierto en 1909 por el Doctor Carlos Chagas; es un organismo pleomórfico que tiene dos fases en su ciclo vital, una fase en el hombre u hospedero reservorio y otra en los insectos transmisores (2).

Desde el punto de vista morfológico, esta especie vive en la sangre como tripanosoma flagelado típico; en las células del sistema fagocítico mononuclear y otros tejidos del hombre y de varios animales, adopta la forma redondeada u ovalada sin flagelo y en el intestino de algunos insectos, como tripanosoma metacíclico (2).

Un interesante aspecto de este parásito es la heterogeneidad en sus propiedades biológicas, tales como contenido de ADN, rango de crecimiento, infectividad, virulencia e histotropismo. La variabilidad genética de *T. cruzi* ha sido documentada por el análisis de patrones electroforéticos de isoenzimas, de patrones de ADN del cinetoplasto y métodos más recientes que permiten la detección de polimorfismos en el contenido genético de los parásitos. Estos factores han llevado a los investigadores al análisis más profundo de las diferentes poblaciones de *Trypanosoma cruzi*, con el fin de caracterizarlas y clasificarlas.

Para entender la diversidad de las manifestaciones clínicas de la infección por *T. cruzi*, es necesario conocer si las cepas y aislamientos del parásito, provenientes de diferentes áreas geográficas o transportadas por diferentes poblaciones de vectores, difieren morfológica, bioquímica e inmunológicamente. Estudios comparativos en cepas de *T. cruzi* son importantes para determinar el posible rol que juega la diversidad de las cepas, en aspectos tales como patogénesis de las diferentes formas clínicas, la variación geográfica en donde se presentan las formas clínicas, el índice de morbilidad y diferencias en los grados de curación en individuos infectados, después de aplicar el tratamiento terapéutico. Para determinar si existe variación intraespecífica, los investigadores se basan en criterios biológicos y bioquímicos a nivel molecular (1,3).

En Guatemala se están reuniendo esfuerzos para una mejor y más específica clasificación y caracterización, de las cepas existentes, las cuales han sido aisladas de diversos hospederos y diferentes lugares de origen.

El presente estudio pretende contribuir a la caracterización de diez cepas aisladas de vectores y de individuos que presentaban enfermedad aguda de Chagas, mediante un método biológico basado en el crecimiento del parásito en cultivo *in vitro*, caracterizando los aislamientos según sus curvas de crecimiento, evaluando dos parámetros: la velocidad en que los parásitos se multiplican en cultivo *in vitro*, considerada como el tiempo que necesita cada una de las cepas para iniciar el aumento en el número de parásitos y la máxima concentración de parásitos que producen las mismas. Además obtener las curvas de crecimiento *in vitro* de las dos cepas control y de esta manera comparar si existe diferencia estadísticamente significativa en el comportamiento de las cepas entre sí y frente a los controles.

III. ANTECEDENTES

A. Morfología de *Trypanosoma cruzi*

Los tripanosomas son protozoos que varían en tamaño desde 10μ hasta más de 1200μ , pero generalmente tienen un tamaño entre 15μ a 100μ dependiendo de la especie (1 - 4).

En la sangre existen dos formas: una larga y delgada y otra corta y ancha, pero probablemente no tienen significación sexual. Las dos formas presentan un núcleo, situado en el centro del cuerpo y un cinetoplasto que es voluminoso en las formas cortas y que aparece como una masa localizada en el extremo posterior. En las preparaciones bien teñidas se ve que el cinetoplasto consta de un blefaroplasto puntiforme y de un corpúsculo parabasal ovoide y de mayor tamaño. La raíz del flagelo, el axonema, nace en el blefaroplasto (2, 3, 5).

Su morfología se puede estudiar mejor en preparaciones teñidas por la técnica de Giemsa, cuyo citoplasma se tiñe de azul, mientras el núcleo, el cinetoplasto y el flagelo, de rojo y violeta (4, 5).

En preparaciones teñidas el tripanosoma frecuentemente asume una forma de C o S lo que es característico de estas especies (2, 4).

Los tripomastigotes, tienen un cinetoplasto situado detrás del núcleo y un flagelo así como una membrana ondulante a lo largo del cuerpo; miden 20μ de largo representan la forma infecciosa no multiplicativa; se ubican en la luz del recto de los insectos transmisores y son infecciosos para los mamíferos (6).

En los tejidos suelen encontrarse formas redondeadas u ovaes que miden de 1.5μ a 4μ de diámetro, sin flagelos ya que su membrana ondulante y el flagelo desaparecen cuando el parásito penetra en la célula. Estos organismos son llamados amastigotes y representan una forma de multiplicación que vive intracelularmente en los hospederos mamíferos (2).

Las células invadidas aparecen en grupos en las vísceras o en el músculo estriado cardíaco (7).

Los epimastigotes son aquellos que tienen el cinetoplasto situado delante del núcleo, un flagelo, una membrana ondulante corta, son fusiformes de unos 20μ de longitud y representan una forma de multiplicación que se encuentra en el tubo digestivo de hospederos invertebrados (6).

Las formas infectivas, tripomastigotes metacíclicos, invaden las células hospederas, pierden la membrana ondulante y el flagelo dividiéndose por fisión binaria, estas formas son liberadas por la destrucción de la célula hospedera. Según la opinión de algunos autores las formas típicas del tripanosoma se desarrollan dentro de la célula, y aparecen en la sangre periférica invadiendo nuevas células hospederas adquiriendo la forma redondeada u ovoide sin flagelo o de amastigote (7).

B. Ciclo Vital.

El parásito tiene un complejo ciclo evolutivo que comprende dos ciclos de desarrollo : uno en el hombre u hospederos mamíferos y otro en el interior de ciertos insectos. Dos estadios principales se desarrollan en el hospedero mamífero, uno presente en la sangre, el estadio de tripomastigote y otro que es intracelular o estadio de amastigote . En el insecto vector, se desarrolla el estadio de epimastigote (4, 8 - 10) .

Entre los reservorios mamíferos de *T. cruzi* se incluye los hospederos vertebrados como el hombre, animales silvestres, animales domésticos y otros mamíferos, entre ellos : armadillo, zarigüeya, rata campestre, zorrillo, gato doméstico y otros incluyendo por lo menos dos especies de monos (4, 11).

Se ha encontrado infección natural con tripanosomas parecidos a *T. cruzi* al menos en 28 especies de reduvidos de los géneros *Panstrongylus*, *Rhodnius*, *Eutriatoma* y *Triatoma*; pero los mejores transmisores son: *Triatoma infestans*, *Triatoma dimidiata*, *Panstrongylus megistus* y *Rhodnius prolixus*. El ciclo de desarrollo puede realizarse en la larva, ninfa o en el insecto adulto y siempre se efectúa en el intestino de la chinche (2, 4)

Los reduvidos o chinches hociconas pueden conservar la infección por mas de dos años, y tal vez toda su vida. Estos viven en los techos de paja o palma, grietas de las paredes de barro no cocido o bajareque (2, 4, 12, 13).

Los insectos transmisores más comunes en Guatemala son el *Triatoma dimidiata* y *Rhodnius prolixus* llamados comunmente "chinches picudas" por su cabeza puntiaguda, "barberos" o "chinches besadoras" porque pican en la cara (13).

En un estudio realizado en Honduras, se estableció que tanto *T. dimidiata* como *R. prolixus* se han adaptado muy bien al ambiente domiciliar, hallazgos que coinciden con los observados en Colombia, Ecuador, Guiana Francesa, Venezuela y algunas regiones de elevada altitud en Bolivia (14).

La infección de los vertebrados ocurre por contaminación con deyecciones, después de la reproducción cíclica que se lleva a cabo en el intestino de la chinche durante un período de incubación de 8 a 20 días . Durante la noche el insecto pica al hombre generalmente en la unión de las superficies cutáneas y mucosas, los tripanosomas metacíclicos salen con las heces y penetran en el hombre y los animales cuando se frotan

en la picadura del insecto o en cualquier lesión de la piel. Así también se producen infecciones por picaduras no contaminadas, evidentemente por regurgitación de tripanosomas metacíclicos o en otros casos por transfusión de sangre de donadores infectados (2, 4, 12).

C. Aislamiento y criterio de identificación.

Las poblaciones de *T. cruzi* han sido aisladas por xenodiagnostico, por cultivo de sangre y en casos agudos por inoculación en ratones recién nacidos. Para amplificar las poblaciones de las cepas aisladas se hace una serie de pasajes a través de distintos modelos de animales, en medio de cultivo axénico y celular (1).

1 Criterio de Identificación.

Durante la dispersión geográfica y biológica del parásito, este ha desarrollado una gran diversidad de subpoblaciones o cepas, las cuales han sido aisladas de varios hospederos y mediante estudios experimentales en el laboratorio se ha demostrado que exhiben distintas características (1).

Los estudios comparativos de las cepas de *T. cruzi* son de importancia para determinar el posible rol que juega la diversidad característica en las cepas de *T. cruzi* en aspectos tales como patogénesis de las diferentes formas clínicas, la variación geográfica de las formas clínicas, índices de morbilidad y diferencias en los grados de curación observados en los individuos después del tratamiento médico (1).

D. Caracterización.

Los estudios de caracterización se basan principalmente en los análisis de las diferencias que el parásito presenta en su desarrollo, tales como su desarrollo en hospederos mamíferos, sensibilidad a agentes quimioterapéuticos, características inmunológicas y bioquímicas. Según el curso de la infección, se sabe que *T. cruzi*

infecta a un amplio rango de hospederos vertebrados y más de 100 especies de animales han sido natural o experimentalmente infectados. Al evaluar la distribución intracelular del amastigote en el tejido, se ha observado que ciertas cepas exhiben un tropismo preferencial por los macrófagos del bazo, hígado, corazón y médula osea. Algunas de estas cepas cuyas características han sido firmemente establecidas empiezan a ser consideradas como prototipos de clasificación (1)

La heterogeneidad morfológica de *T. cruzi* ha sido extensamente documentada al comparar aislamientos provenientes de diferentes hospederos o al aislar parásitos durante el curso de una infección que exhibe parasitemia. Hoy en día se considera que las diferentes formas que muestra el parásito se debe más a su capacidad a cambiar de amastigote a tripomastigote por el proceso denominado morfogénesis, que a la existencia de parásitos que siempre exhiben una determinada morfología (14).

A diferencia de la gran variedad de formas morfológicas que muestran los diferentes aislamientos de *T. cruzi*, algunos parámetros biológicos sí parecen estar asociadas con una población o aislamiento determinado de parásitos, el cual al ser caracterizado biológicamente pasa a ser considerado una cepa (14).

Entre éstos parámetros estudiados se incluyen el período prepatente de la enfermedad, los patrones de infectividad, virulencia, evaluación histopatológica de animales que sobreviven a la infección aguda, lo que permite determinar si el organismo es capaz de producir la enfermedad crónica (15).

Por la susceptibilidad a drogas se dice que existe un amplio rango de sensibilidad a agentes quimioterapéuticos entre las cepas, siendo un gran número naturalmente resistentes a las drogas usadas rutinariamente en la enfermedad de Chagas. Se ha demostrado que algunas cepas obtenidas de áreas del sur de Brazil, son mucho mas sensibles a ciertas drogas que aquellas del sureste de Brazil (1).

1. Caracterización Inmunológica.

La caracterización inmunológica requiere de un número mas avanzado de métodos complejos. Estudios de componentes marcadores de la superficie del parásito, han demostrado la existencia de antígenos específicos de cada stock de cepas, además de las glicoproteínas comunes a todas las cepas. Sin embargo, la tipificación basada en características antigénicas no ha concluído aún. Aunque varios investigadores han descrito métodos axénicos en los cuales se puede inducir la transformación de tripomastigotes a amastigotes, no hace mucho tiempo se pensaba que los amastigotes eran un estadio de *T. cruzi* de vida intracelular obligatoria. La evidencia definitiva de que amastigotes inducidos *in vitro* bajo condiciones acelulares son idénticos a los amastigotes intracelulares, se ha obtenido al demostrar que ambos comparten antígenos de superficie (14).

Adicionalmente, este hallazgo permite estudiar la expresión de antígenos estadio-específicos durante el proceso de morfogénesis, o sea el proceso por medio del cual los tripomastigotes se transforman a formas típicas de amastigotes (1, 14).

En un estudio realizado por Cosenza y col. con varios aislamientos de *T. cruzi* de Honduras con el fin de evaluar la capacidad de los tripomastigotes de transformarse de tripomastigotes *in vitro* a formas de amastigotes y de expresar durante el proceso de morfogenesis, ciertos antígenos de superficie característicos de dichos estadios. Se analizaron cuatro aislamientos, uno obtenido de un insecto *T. dimidiata* (CHI), otro aislado por xenodiagnóstico de un paciente durante la fase aguda de la infección y los otros dos, aislados de pacientes en la fase crónica de la enfermedad y con cardiopatía avanzada. Los resultados demuestran claramente que los parásitos de los 4 aislamientos fueron capaces de transformarse de tripomastigotes a formas características de amastigotes, sin embargo la morfogénensis fue mas completa y sincronizada en ciertos

aislamientos. Por lo tanto parece ser que la morfogénesis es un fenómeno que se puede generalizar a todas las cepas de *T. cruzi* (15).

También se puede apreciar el porcentaje de parásitos que expresan los antígenos SAPA (Shedded Acute Phase Antigen) que han sido descritos ser tripomastigote específicos y Ssp4 (Stage-specific protein 4) asociado exclusivamente con amastigotes, durante el proceso de morfogénesis. Es evidente que hay una relación directa entre la presencia de tripomastigotes y la expresión de SAPA como también entre la predominancia de amastigotes y la expresión del antígeno Ssp4. Los resultados sugieren que la morfogénesis es un proceso dinámico durante el cual los parásitos cambian sus estructuras de superficie y por lo tanto su genotipo antigénico. Adicionalmente la expresión de los antígenos SAPA y Ssp4 es característica de todos los aislamientos de *T. cruzi* lo cual hace de dichos antígenos, candidatos a ser usados en las pruebas serológicas a fin de diferenciar entre individuos que están en la fase aguda de la infección de aquellos que ya han progresado a la fase crónica de la enfermedad (15).

2. Caracterización bioquímica.

Las características intrínsecas a nivel molecular, las cuales no son influenciadas por la manipulación en el laboratorio, empiezan a ser usadas para la identificación de *T. cruzi*. El análisis isoenzimático fue uno de los primeros métodos usados para la clasificación bioquímica de aislamientos de *T. cruzi* provenientes de diferentes países del continente Americano (1).

Mediante la técnica de electroforesis en gel de capa fina de diferentes cepas del parásito se logra la detección de enzimas que tienen similar o diferente actividad. Dichos análisis han llevado a la descripción de variados perfiles isoenzimáticos denominados zimodemas, los cuales han sido usados para tratar de asociar determinado zimodema, ya sea con el ciclo de vida domiciliar o silvestre del parásito y con la sintomatología clínica de la Enfermedad de Chagas prevalente en determinada región de las Américas (1).

Se han realizado esfuerzos con el fin de demostrar la posible asociación entre las cepas de *T. cruzi*, con la presencia de infección, características epidemiológicas y las manifestaciones clínicas de la enfermedad. Entre los métodos usados para la caracterización de *T. cruzi* están los que se basan en patrones de isoenzimas y de ADN del cinetoplasto. Basados en los patrones isoenzimáticos, Carneiro y colaboradores agruparon sesenta y nueve cepas, aisladas de pacientes con enfermedad crónica de Chagas procedentes del área endémica de Bambuí, estado de Minas Gerais, dentro de cuatro grupos de zymodemos A, B, C y D. Estas mismas cepas fueron también clasificadas de acuerdo a los patrones de ADN del cinetoplasto generados por digestión con endonucleasas de restricción siendo agrupados en esquizodemos. El número de esquizodemos observados fue grande comparado con el número de zymodemos observados, hasta que se separaron algunos zymodemos en subgrupos (16).

a. Caracterización por Zimodemos

Los patrones isoenzimáticos se obtienen a partir de extractos enzimáticos Carneiro y col. (1990), recomiendan utilizar para la clasificación las isoenzimas: alanina aminotransferasa [E. C. 2.6.1.2] aspartato aminotransferasa [E.C. 2.6.1.1] enzima málica [E.C.1.1.1.40], 6-fosfogluconato dehidrogenasa [E.C.1.1.1.44], fosfoglucomutasa [E.C.2.7.5.1], glucosa 6-fosfatasa dehidrogenasa [E.C.1.1.1.49], glucosa fosfato isomerasa [E.C.5.3.1.9], y malato dehidrogenasa [E.C.1.1.1.37]. Los resultados demuestran que según los grupos de zimodemos algunos se adaptan al ratón más que otros y que presentan distinto comportamiento en ratón (16)

Mediante el análisis de cepas aisladas de diferentes hospederos y diferentes áreas endémicas, se ha establecido la existencia de al menos tres zimodemos principales (Z1, Z2, Z3). Según los estudios epidemiológicos, las cepas Z1 fueron aisladas de pacientes con enfermedad crónica de Chagas y animales domésticos, mientras que Z2 Y Z3 fueron halladas en vectores y reservorios del ciclo selvático (1, 14).

En otros estudios con aislamientos de diversas fuentes y hospederos, se ha encontrado que el zimodemo 1 predomina en el ciclo doméstico, ya que todos los aislamientos analizados de vectores provinieron de triatomíneos capturados en el intradomicilio (14, 17).

La caracterización bioquímica también se basa en las diferencias del desarrollo de la parasitemia en mamíferos y la sensibilidad a agentes terapéuticos para lo cual se requiere de un modelo animal en el cual se pueda reproducir reacciones similares a las que suceden en el ser humano (1).

b. Caracterización por Esquizodemos.

La Caracterización por esquizodemos está basada en marcadores genotípicos. Los marcadores genotípicos se obtienen por el análisis de los perfiles de ADN del cinetoplasto. Fragmentos de ADN del cinetoplasto son producidos por las enzimas endonucleasas de restricción que reconocen y discriminan entre secuencias específicas de nucleótidos de ADN. Los fragmentos son separados por métodos fisicoquímicos produciendo patrones específicos de ADN. Cepas que presentan patrones similares de ADN del cinetoplasto son agrupadas en esquizodemos, pero debido a la gran heterogeneidad de los perfiles de esquizodemos impiden su uso como un sistema de caracterización para *T. cruzi* (18).

c. Caracterización por Huellas Digitales del ADN.

Se han desarrollado nuevos instrumentos en la caracterización de *T. cruzi*, usando huellas digitales del ADN. Jeffreys y col. fueron los primeros en demostrar la existencia de un nuevo componente del genoma eucariótico, los minisatelites que se componen por segmentos repetitivos cortos, constituidos por motivos básicos unidos uno tras otro. Estos minisatelites son hipervariables, debido al gran polimorfismo en el número de las secuencias repetidas entre especies semejantes y se encuentran en el genoma en secuencias distribuidas a partir de un centro común. Las sondas diseñadas para reconocer

el centro original hibridizan simultaneamente a varios minisatélites, generando complejos patrones de banda específicos e individuales que fueron llamados "DNA fingerprints" o huellas digitales del ADN. Ha sido demostrado posteriormente que sondas aisladas de humanos pueden ser usadas para reconocer minisatélites en otros organismos incluyendo protozoos (19, 20).

En un estudio en el cual se usó hibridización no radioactiva, para demostrar que las sondas multilocus aisladas de humano de Jeffreys reconocen múltiples regiones minisatélites del ADN nuclear de *T. cruzi*, produciendo patrones de banda cepa-específicos típica de huellas digitales del ADN en la técnica Southern blot. Estos procedimientos constituyen una nueva herramienta para el estudio y la caracterización de cepas y clones de *T. cruzi* (19).

La sonda 33.15 multilocal de ADN aislada de humano es capaz de identificar minisatélites en genomas de *T. cruzi*, generando complejos patrones de banda típicos de huellas digitales de ADN, cepa-específicos. Según el estudio realizado, no existe evidencia definitiva de que las bandas de huellas digitales se deriven de múltiples loci, sin embargo la variación observada en dos de los tres clones de la cepa Y presentaron variación en tres bandas. Así el estudio de éstos minisatélites hipervariables surge como inicio de un gran potencial, en términos de proveer marcadores genéticos para correlacionar con características biológicas así como patogenicidad, susceptibilidad a lisis mediada por complemento y resistencia a quimioterapia (18).

Es importante mencionar además, que un método de rutina ideal para la caracterización de cepas y clones de *T. cruzi* debe tener las siguientes cualidades básicas: alto poder de resolución, buena estabilidad y simplicidad técnica. El método de huellas digitales del ADN, posee las primeras dos cualidades a un nivel que ligeramente se asemeja al método de análisis de ADN del cinetoplasto. Técnicamente es simple ya que

usa ADN total con una alta sensibilidad y es necesaria solo una enzima de restricción. Además, tiene la ventaja de investigar el ADN nuclear, donde ocurre el más importante fenómeno evolucionario. Se considera que con éste método se da inicio a un potente marcador molecular de importancia, con respecto a las características biológicas y patogénicas de *T. cruzi* (15).

3. Caracterización por Curvas de parasitemia

El modelo animal de experimentación para el estudio de *T. cruzi in vivo* más utilizados es el ratón, por ser fácil de manipular y reproducir, además al igual que en el humano se desarrolla inmunidad al parásito durante la infección primaria lo cual se refleja por la resistencia al recobrase de infecciones letales y por la respuesta inmune inducida por la producción de anticuerpos específicos linfocito sensible. En éstos modelos animales se ha encontrado que la susceptibilidad a infección aguda puede variar entre las distintas cepas de ratones (21).

Las curvas de parasitemia consisten básicamente en la realización de gráficas, que permiten visualizar la cantidad de parásitos que se desarrollan durante el transcurso del tiempo, mediante la infección artificial de algún modelo animal (20).

Brener realizó curvas de parasitemia con las cepas brasileñas CL y Y, las cuales inoculó intraperitonealmente en ratones albinos de 18 - 20 g. de peso, encontrando que la cepa Y presenta un pequeño incremento en la población el día 18 sin mostrar declinación (22).

Monroy realizó un estudio de curvas de parasitemia, con cuatro cepas aisladas del oriente de Guatemala, encontrando que las cepas presentan en ratón baja parasitemia y una mortalidad casi nula, con picos altos después del día 20 de la inoculación, comportamiento que es similar a las cepas caracterizadas como tipo III o venezolanas caracterizadas también como Zimodemo 1, por ser virulentas y con preferencia a parasitar el musculo esquelético (23,24)

Rodas Retana realizó un estudio con cinco cepas de *T. cruzi* aisladas de los vectores *Triatoma dimidiata* y *Triatoma nitida*, provenientes de la aldea San Cristobal, Villa Canales, departamento de Guatemala. Las cepas fueron inoculadas en ratón encontrándose que presentaron características comunes entre ellas su capacidad de reproducirse en ratón, presentar parasitemia el día 5 después de la inoculación, producir parasitemia alta entre los días 21 - 30 y producir daño al modelo animal en mayor o menor grado, el cual se manifestó por piloerección, parálisis de miembros inferiores, meteorismo y hepatoesplenomegalia. Presentaron algunas diferencias importantes, con respecto a la mortalidad entre ellas: la cepa 1 presentó alta parasitemia en los días 23-30, un pico máximo el día 28 y una mortalidad del 10 por ciento. La cepa 2 se eliminó del análisis estadístico por no poder construir la curva de parasitemia debido a parasitemia muy alta y una mortalidad del 100%, considerándose a ésta cepa como la más patógena. La cepa 3 presentó alta parasitemia en los días 26-30 y un pico máximo el día 26, siendo ésta la cepa que presentó la curva de parasitemia más baja, y una mortalidad del 20%, lo que puede explicar porqué la parasitemia detectada en la población infectada, puede ser muy baja o imperceptible y la serología puede ser muy pobre. La cepa 4 presentó una parasitemia elevada con un pico máximo el día 28, fue la única que no causó mortalidad en los ratones. La cepa 5 presentó un pico máximo el día 28 siendo ésta la cepa que presentó la curva de parasitemia más alta y unicamente un 10% de mortalidad. Al comparar los parámetros de infectividad, virulencia y mortalidad, estos no son generales para el parásito sino más bien características propias de cada cepa por lo que no existe relación directa entre infectividad y mortalidad. (20).

En un estudio realizado en Brasil en 1,991 por Carneiro y colaboradores, para la caracterización biológica de cepas de *T. cruzi* clasificadas en diferentes grupos de zimodemos y en esquizodemos mediante la preparación de curvas de parasitemia y

basados en patrones isoenzimáticos. Carneiro y colaboradores agruparon sesenta y nueve cepas, aisladas de pacientes con enfermedad crónica de Chagas, del área endémica de Bambuí, Estado de Minas Gerais, dentro de cuatro grupos de zymodemos A, B, C y D. Las curvas de parasitemia se iniciaron, después de un período de adaptación inoculando las cepas de parásitos en ratones machos (C3H isogénico). La parasitemia fué monitoreada todos los días después del cuarto día de infección evaluando frotis de sangre en fresco. Según los resultados obtenidos se manifestaron dos clases de parasitemia entre las cepas en estudio. Siete poblaciones de cepas de las nueve produjeron curvas de parasitemia con una larga duración, picos irregulares, variando en nivel y en el período de máxima circulación de parásitos y dos poblaciones de cepas presentaron parasitemia ascendente, con rápida multiplicación de los parásitos y de corta duración. Un dato interesante de éstos ensayos es que se observó que las curvas de parasitemia no fueron alteradas a través de los pasajes realizados en ratón. (20).

Al comparar la infectividad de las cepas con su zimodemo, usando en este estudio la clasificación en cuatro grupos denominados A, B, C y D, fué posible la separación de las cepas del zimodemo C de los otros zimodemos A, B, y D ya que éstas últimas presentaron una parasitemia patente, mientras que las cepas de zimodemos C la presentaron subpatente. Sorpresivamente, una de las cepas cambió de una parasitemia subpatente a una parasitemia patente después del octavo pasaje alterno (hemocultivo-raton-hemocultivo) (16,25).

Los cambios en el comportamiento biológico de las cepas de *T. cruzi* al ser mantenidas por pasajes seriados en ratón, han sido bien descritos por otros autores, observándose mas frecuentemente un incremento en la virulencia (definida por parasitemia y mortalidad). El rango de mortalidad en ratón es expresado como el porcentaje acumulado de animales muertos durante 120 días después de la infección con la

cepa. Los resultados de estos estudios sugieren que los pasajes alternos de una de las cepas, selecciona a una subpoblación de parásitos mas adaptada al desarrollo en ratón, aunque ésto no ocurre con las otras tres cepas en las mismas condiciones (16).

En este mismo estudio realizado se evaluó la morfología del parásito por frotos de sangre fresca los que fueron observados con objetivos de inmersión y en contraste de fases. Los resultados se expresaron como porcentaje de formas delgadas, anchas y muy anchas. Se encontró que siete cepas presentaron una predominancia de formas mas anchas durante la infección y que solamente dos cepas presentaron formas delgadas al empezar la infección y muy anchas posteriormente. Juntamente se evaluó su histotropismo, para ello se examinaron el cerebro, corazón, bazo, hígado y musculo esquelético, y se registró el nivel de infiltración inflamatoria y la localización preferencial de amastigotes, encontrandose que las formas anchas mostraron tropismo preferencial hacia el corazón y músculo esquelético, las que fueron confirmados por otros estudios realizados posteriormente (20).

Otro estudio realizado en hospederos vertebrados corresponde también a uno realizado con la cepa llamada Tuolumne, aislada del primer caso autóctono de tripanosomiasis en California. Se detectó que el período prepatente de la cepa fue a los 8-23 días. La mayoría de los ratones (59%) fueron positivos a los 10-14 días después de la infección y solamente un ratón lo fué al octavo día. En el resto de los ratones, la parasitemia se desarrolló gradualmente sobre los próximos 9 días y al final del día 23 todos los ratones tenían tripomastigotes circulantes (14).

Las cepas estudiadas, demuestran que cepas que presentan el mismo patrón de esquizodemos presentaron a la vez alta virulencia con 100% de mortalidad, sugiriendo una correlación entre esquizodemos y una alta virulencia (16).

4. Caracterización por generación de formas infectivas.

En la Universidad de California se caracterizó biológicamente una cepa de *Trypanosoma cruzi* aislada de un paciente con enfermedad de Chagas. La cepa fue cultivada y éste cultivo fue usado como fuente de inóculo tanto para cultivos en tejido como para estudios en vertebrados con el propósito de determinar la infectividad y virulencia de ésta nueva cepa (14)

Para determinar la presencia de tripomastigotes metacíclicos en el inóculo inicial y la variación de los mismos con respecto al tiempo, los cultivos fueron evaluados durante un período de 72 días a partir de la inoculación (14).

Los resultados demostraron que una nueva generación de tripomastigotes metacíclicos aparecen entre el día 18 y 22 con otro pico alrededor del día 28 y en los días 54-60. Aunque había una considerable variación en el número de metacíclicos presentes, todos los cultivos contenían un número suficiente de parásitos para infectar a ratones de laboratorio (14).

En un estudio realizado en la Universidad de México, 17 cepas mexicanas de *Trypanosoma cruzi* y 5 cepas de Sur América como referencia, fueron analizadas y sometidas a digestión del ADN por la enzima de restricción *Hind* III. Los resultados mostraron un polimorfismo en los fragmentos largos, asociados con genes espaciadores de ARN ribosomal. También fueron sometidos a digestión por la enzima *Hinf* I, que fragmenta el ADN total. Se demostró la ocurrencia de heterogeneidad genética entre estos aislamientos. La agrupación jerárquica o no jerárquica de éstas características moleculares permitieron la formación de grupos que correlacionaban con el área geográfica de origen de los aislamientos (26).

Otro hallazgo importante en el uso de la enzima de restricción *Hinf* I, para la digestión de los fragmentos de ADN es la notable facilidad para identificar los maxicirculos del cinetoplasto por medio de la separación de ADN total. Lo cual constituye la simplificación de los protocolos previos sobre el método de huellas digitales de ADN del cinetoplasto, ya que no se necesita una ultracentrífuga o una centrífuga de alta velocidad para la separación de ADN del cinetoplasto por su alto peso molecular (> 4 kb). El ADN es preparado sencillamente y los procedimientos pueden ser realizados en laboratorios clínicos de los países en desarrollo, además los resultados que se obtienen son similares a aquellos hechos con minipreparaciones de ADN. Este procedimiento puede ser útil para realizar un amplio estudio epidemiológico en un corto período de tiempo (18).

5. Combinación de métodos de caracterización.

Los esquizodemos de 56 stocks de *T. cruzi* provenientes de humanos, animales e insectos del área de Brasil, Venezuela, Colombia y Costa Rica fueron analizados por amplificación mediante la reacción en cadena de la Polimerasa (PCR) de las secuencias de la región variable del minicirculo del ADN del cinetoplasto. Los patrones de ADN del cinetoplasto fueron comparados y los stocks agrupados en dos esquizodemos. Se obtuvo también perfiles de restricción que permitían la construcción de un esquizodemo adicional, además dos oligómeros fueron generados de las secuencias de regiones variables del clonaje de los minicirculos de ADN. El resultado indica que una combinación de enzimas de restricción, huellas digitales y de hibridización por medio de la amplificación pueden ser usadas con sondas específicas tanto para una detección sensible, como para una clasificación de *T. cruzi* (26).

Sturm N y col. realizaron un estudio sobre la sensible detección y clasificación por esquizodemos por medio de la amplificación de secuencias de minicirculos de ADN

del cinetoplasto usando pequeños números de células de *T. cruzi*. Se amplificaron dos fragmentos de regiones minirepetidas del minicírculo de ADN. Se consideró que la cantidad mínima de minicírculos de ADN requerida para detectar un producto por hibridización con una sonda de oligonucleótido marcada es de 0.05fg (0.1% de el componente de ADN). Este procedimiento permitió la obtención de ADN del cinetoplasto de menos de 10 tripanosomas en sangre completa el que puede usarse como un molde para amplificación, demostrándose que el exceso de ADN humano no interfiere en la amplificación. Además los análisis de esquizodemos por hibridización con oligonucleótidos específicos pueden también ser preparados a partir de las regiones o fragmentos de ADN amplificados. Los autores de éste estudio consideran que éste método puede ser utilizado como un ensayo rápido, específico y sensible aplicado a pacientes con enfermedad crónica de Chagas así también para estudios epidemiológicos en animales e insectos infectados (26).

6. Caracterización por polimorfismo genético.

En un estudio realizado en el Instituto Nacional de Salud, en Bethesda en 1993 se descubrió, durante un ensayo de rutina de un stock de las cepa Y-02, la aparición natural de variantes del ADN en derivados de una célula única de *Trypanosoma cruzi*. Tres tipos variantes de ADN fueron aislados; uno fue indistinguible del stock progenitor u original según las bases de ADN total por célula. Los otros dos tipos contenían aproximadamente 30% y 70% más ADN por célula que el stock original, las diferencias en el contenido de ADN involucraba tanto al núcleo como al cinetoplasto. Los análisis de la población de epimastigotes, de isoenzimas y esquizodemos respecto al tiempo de crecimiento no mostraron diferencias relacionadas con las variantes. Las variaciones consistieron en un marcado polimorfismo del cariotipo en la electroforesis en gel de campo pulsátil y en el polimorfismo en la longitud de los fragmentos detectados en la

hibridización de algunas muestras tratadas con endonucleasas de restricción. McDaniel y Dvorak postularon que las variantes del clon Y-02 presentan homología genética, formando híbridos estables o aneuploides que según ellos proveen a *T. cruzi* de un mecanismo para sobrevivir a las alteraciones en el medio ambiente, promoviendo heterogeneidad entre las células y además la diversidad observada en la presentación y curso de la Enfermedad de Chagas (27 - 30).

IV. JUSTIFICACIONES

Trypanosoma cruzi es un protozoo parásito de gran importancia biológica y médica. Constituye el agente causal de la enfermedad de Chagas que afecta a varios millones de personas en Centro y Sur América.

Las diferencias intraespecíficas de este parásito han sido descritas por algunos investigadores en aspectos biológicos, inmunológicos, farmacológicos y bioquímicos, así como en estudios de caracterización con métodos bioquímicos e inmunológicos, entre ellos el uso de patrones de isoenzimas y ADN del cinetoplasto digeridos con endonucleasas de restricción, así como la gran heterogeneidad observada en sus antígenos de superficie. Se ha observado que muchos de estos elementos tienen un gran significado en el grado de virulencia presentado por las diferentes cepas.

Debido a que Guatemala se considera un país en que la Enfermedad de Chagas es un problema de Salud Pública, se hace necesario llevar a cabo estudios de análisis y caracterización de las cepas de *Trypanosoma cruzi* aisladas por algunos investigadores de la Universidad de San Carlos de Guatemala. A la fecha ésto no se ha realizado en Guatemala y para tal efecto se están uniendo esfuerzos a fin de caracterizar las cepas existentes, por lo que en el presente trabajo de investigación se pretende estudiar las cepas de *Trypanosoma cruzi* mediante un método basado en la medición del crecimiento de los parásitos en base a dos parámetros: velocidad de multiplicación de los parásitos con respecto al tiempo y máxima concentración de parásitos y de esta manera comparar entre sí las cepas.

El método de caracterización posee la ventaja de ser sencillo y fácil de aplicar mediante conocimientos básicos, aunque tiene la desventaja de requerir un alto control de parte del investigador en el correcto manejo de los cultivos. El método se eligió porque la información que se obtiene del cultivo *in vitro* es muy importante para completar la caracterización de los aislamientos guatemaltecos.

V. OBJETIVOS

A. General

Contribuir a la caracterización de *T. cruzi* aislados en Guatemala.

B. Específicos

1. Caracterizar cuatro cepas aisladas de humano mediante curvas de crecimiento de parásitos *in vitro*.
2. Caracterizar cuatro cepas aisladas de insectos vector mediante curvas de crecimiento de parásitos *in vitro*.
3. Obtener las curvas de crecimiento *in vitro* de las dos cepas control .
4. Comparar las curvas de crecimiento de parásitos contra las cepas control y entre sí.

VI. HIPOTESIS

Las cepas guatemaltecas de *T. cruzi* aisladas de pacientes y de vectores presentan el mismo comportamiento en el transcurso de su crecimiento en cultivo *in vitro*.

VII. MATERIALES Y METODOS

A. Universo de trabajo y muestra:

El universo de trabajo estuvo constituido por las cepas : MHOM/GT/93/SMI-01, MHOM/GT/94/SMI-05, MHOM/GT/95/SMI-07, MHOM/GT/94/SMI-04 aisladas de individuos residentes del municipio de Santa María Ixhuitán, departamento de Santa Rosa, que presentaban signos y síntomas clínicos de la enfermedad de Chagas en su fase aguda. Las cepas ITD/GT/93/DD7; ITD/GT/93/DD14; ITD/GT/93/DD15; ITD/GT/93/DD16, cepas aisladas del agente vector, insecto *Triatoma dimidiata* en el año de 1993, aisladas por la Licda. Dina Dubón y las cepas Tulahuen, procedente de Chile y Y procedente de Brasil las cuales se usaron como controles.

B. Medios:

1. Recursos humanos:

Autora del trabajo: Br. Dina Aracely Cruz Mérida.

Asesora de Tesis: Licda. Vivian Matta

Colaborador: Dr. Tetsuo Yanagi.

2. Recursos Institucionales :

Departamentos de Citohistología, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia.

Universidad de San Carlos de Guatemala.

Agencia Japonesa de cooperación Internacional (JICA)

Triptosa

Caldo de Infusión de hígado

Suero Bovino fetal liofilizado

Etanol al 70%

Giemsa

Aceite de inmersión

3. Recursos de experimentación

Epimastigotes de los aislamientos de *T. cruzi* cultivados en medio LIT a una concentración de 2×10^6 parásitos en 15 ml de medio.

D. Procedimiento:

1. Preparación del Medio LIT (para 1000 ml con FBS al 10%)

Sol A. NaCl	4.0 g.	
Kcl	0.4 g.	/ Se disolvió en agua desmineralizada y obtener un volumen de 790 ml. y autoclavar.
Na ₂ HPO ₄ .12 H ₂ O	20.2 g	
Triptosa	5.0 g	

Sol. B. Caldo de Infusion de Hígado 3.0 g (50 ml de sol estéril al 6% de LIB)

Sol. C. Glucosa 2.0 g (40 ml de sol. esteril de glucosa al 5%)

Sol. D. FBS (Suero Bovino Fetal) estéril 100 ml

Sol. E. Células sanguíneas rojas lisadas (RBC) 20 ml

Se unieron las soluciones de la A a la E en un recipiente estéril, dentro de una campana de flujo laminar y con pipetas estériles observando las indicaciones para conservar la esterilidad.

2. Caracterización por curvas de concentración *in vitro*

- Preparación del inóculo: A partir del cultivo stock se prepararon una serie de diluciones utilizando medio LIT estéril hasta obtener un recuento de 2×10^6 parásitos en 15 de medio, se trabajo con sumo cuidado a fin de disminuir la posibilidad de ser una fuente que aportara variabilidad en el proceso.

-La última dilución que contenía 2×10^6 parásitos en 15 ml de medio LIT y se incubó a 27°C.

-Al cumplir el primer día de incubación, se realizó el primer recuento de parásitos para lo cual se trabajó dentro de la campana de flujo laminar previamente desinfectada. Usando pipetas estériles se procedió a agitar el medio de cultivo aspirando varias veces para homogenizar el medio y se colocó una gota del cultivo en la cámara de Neubauer. Este procedimiento se repitió para cada uno de los cultivos y sus 7 repeticiones.

- En los días subsiguientes de incubación se realizaron los recuentos en días alternos hasta completar el período de 21 días.

- Se realizaron los recuentos contando los parásitos presentes en los cuadrantes de las esquinas de la cámara de Neubauer.

- El conteo de parásitos/ml de medio LIT se obtuvo multiplicando el conteo por el factor según una tabla de conversiones usada por Dr. Tetsuo Yanagi.

- Los recuentos se hicieron en días alternos hasta completar un período de 21 días.

- A partir de los recuentos de cada repetición de cada uno de los aislamientos se obtuvieron los promedios.

- Con los promedios se plotearon las curvas, representada por la concentración de parásitos vrs el día de recuento (31,32).

- A partir de estas curvas se evaluaron los parámetros de caracterización.

3. Caracterización por morfometría de los parásitos.

-Se preparó una serie de frotos de cada aislamiento colocando una gota del cultivo tomada en el momento de hacer los recuentos respectivos, a continuación se fijaron y tiñeron con colorante Giemsa.

-Para todos y cada uno de los frotos por aislamiento, se procedió a medir los parásitos con la escala del ocular micrométrico previamente calibrado con la platina micrométrica obteniendo el factor de conversión. Las mediciones se realizaron con el objetivo de inmersión (100x) (34, ver anexos gráfica No6).

E. Diseño Experimental

Curvas de Concentración de parásitos *in vitro*

Diseño completamente al azar (10 tratamientos = grupos = cepas)

Se aleatorizó cada día en que se inoculó, para la asignación de tratamientos .

El número de repeticiones hechas fueron ($n_j = \#$ de curvas por cada cepa)

$$n = \frac{2NC^2 \sigma}{\Delta^2}$$

$$\Delta^2$$

1. Nivel de Confianza: $NC = 3.632$

2. Varianza (σ^2)

Variabilidad esperada

3. $\Delta =$ Límite de Error : Distancia mínima entre 2 medidas a partir de la cual se consideran diferentes. Se trabajó con:

$$\Delta = 2\sigma$$

Por lo que $n = 7$ con valores de alfa igual a 0.05 y valores de beta igual a 0.20 con un NC igual a 3.632

Caracterización por Morfometría

El diseño fué completamente al azar. El número de mediciones hechas para cada frote fué tomada por conveniencia con un $n = 50$.

Los parámetros medidos fueron longitud y ancho del cuerpo del parásito.

F. Análisis de Resultados:

El análisis de resultados que se aplicó a las curvas fué el siguiente:

Análisis de varianza no paramétrico (Kruskal-Wallis) para evaluar la velocidad de multiplicación.

Análisis de varianza de una vía (paramétrico) para evaluar los recuentos (concentración de parásitos) utilizando el área bajo la curva de crecimiento

Como se obtuvieron diferencias significativas se procedió de la siguiente manera:

1. Para la densidad de crecimientos se realizaron comparaciones múltiples pareadas entre los rangos de cada cepa (método no paramétrico).
2. Para la velocidad de crecimiento se hicieron comparaciones por pares por medio de la prueba de colinealidad.

El análisis de resultados aplicado a la morfometría fué el siguiente:

Análisis de varianza de una vía para cada parámetro medido.

Se encontró diferencia significativa entre los aislamientos para el parámetro de longitud por lo que se efectuó la prueba de comparaciones múltiples de Fisher o Mínima diferencia significativa (LSD).

VIII. RESULTADOS

Todos los aislamientos alcanzaron la mayor concentración de parásitos en días diferentes, siendo el aislamiento SMIS-01 el que presentó la mayor concentración de parásitos (4.89×10^8) entre los días 10-18 con un pico máximo el día 18. Por el contrario el aislamiento DD15 presentó la menor concentración de parásitos, con respecto a los otros aislamientos, durante los días 18-21 con un pico máximo el día 18 (2.91×10^8). Los demás aislamientos mostraron concentraciones oscilantes entre estas cantidades y variaron también en su día pico de máxima concentración (Tabla No. 1).

Con los resultados obtenidos se graficaron las curvas para cada cepa y con cada área bajo la curva se hizo el Análisis de Varianza (ANDEVA) de cada cepa, encontrándose que los aislamientos son diferentes y que la hipótesis H_0 ($H_0 = \mu_1 = \mu_2 = \mu_3 \dots = \mu_{10}$) se rechaza (Gráfica No.1)

Al comparar la concentración de parásitos de todos los aislamientos con respecto a la concentración de parásitos producida por las cepas control, Y y TULAHUEN, se encontró que el aislamiento SMIS-01 se destaca por presentar la mayor concentración de parásitos respecto a éstas, mientras que la cepa DD7 presentó una concentración muy cercana a éstas y la cepa DD15 presentó una concentración menor a éstas (Anexos ver Tabla No. 2 y Gráficas No.1, No.2, No.3 y No. 4).

En relación a la velocidad de multiplicación de las cepas del estudio con respecto a la velocidad de multiplicación de las cepas control, considerando a la velocidad como el área bajo la curva vrs. tiempo todos los aislamientos presentaron mayor velocidad frente a la cepa control Y, mientras que seis de los aislamientos presentaron mayor velocidad frente a la cepa control Tulahuén; los resultados se muestran en la tabla No. 3. (ver anexos)

Al comparar cada uno de los aislamientos entre todos los del estudio, por pares, aplicando la prueba de colinealidad; según un análisis de prueba de hipótesis se encontró diferencia significativa por la prueba estadística de "t de student" ("t crítico" de $\alpha = 0.05$ y si "t calculado" es $\geq \pm 2.39$) por lo que la H_0 de igualdad se rechaza.

Mediante la prueba de Fisher se obtuvieron resultados interesantes que nos indican que entre algunos aislamientos guardan una mínima diferencia no significativa. La cepa control Tulahuén presentó diferencia significativa con todos los aislamientos excepto con SMIS-01, SMIS-04 y SMIS-05, La cepa control Y presentó diferencia significativa con todos los aislamientos excepto con SMIS-01, SMIS-04, DD7, DD14, DD16, los resultados se muestran en la tabla No. 4 (ver Anexos Grafica No.5).

Con respecto a la caracterización por morfometría, todas las mediciones de ancho de los parásitos en su fase epimastigote, no presentaron diferencia alguna entre los aislamientos y frente a los controles. Respecto al parámetro de longitud, (Tabla No. 5) las mediciones mostraron diferencias entre los aislamientos y frente a los cotroles, confirmando éstas diferencias mediante la prueba de Fisher o de mínima diferencia significativa destacandose la mayores diferencias entre, el aislamiento SMIS-01 respecto a SMIS-04, DD7 y Y; el aislamiento SMIS-04 respecto a DD16 y a TULAHUEN; el aislamiento SMIS-05 respecto a DD16 y TULAHUEN; SMIS-07 respecto DD16 y TULAHUEN; el aislamiento DD7 respecto a DD16 y TULAHUEN; el aislamiento DD14 respecto a DD16 y TULAHUEN; el aislamiento DD15 respecto a DD16; el aislamiento DD16 respecto a Y (Tabla No 4 ,Grafica .No.7).

IX. DISCUSION DE RESULTADOS

La técnica empleada en la preparación de las curvas del presente estudio fué aplicada de manera sencilla para la caracterización de estos aislamientos, sin embargo podemos mencionar que las condiciones necesarias para la preparación de los cultivos son especialmente delicadas por el hecho de que todo equipo y materiales necesarios deben mantenerse completamente estériles, ya que de otra forma una contaminación de los cultivos provocaría la pérdida de trabajo y materiales. Así mismo podemos mencionar que el medio de cultivo se preparó con sumo cuidado tanto en la medición de los suplementos del medio LIT así como total asepsia en la preparación y su adecuado almacenamiento.

La preparación del inóculo inicial fué de gran importancia, el cual se trabajó con cuidado a fin de disminuir la posibilidad de ser una fuente que aportara variabilidad en el proceso. En esta parte fué importante hacer correctamente el recuento de los parásitos de los diez cultivos stocks, ya que de esto depende que el resultado final tenga la cantidad de parásitos establecida para el inóculo inicial. Para lograr los resultados esperados es recomendable tener los conocimientos básicos respecto al uso de la campana de flujo laminar así como del correcto manejo de las pipetas estériles y la manipulación de los cultivos a fin de evitar cualquier contaminación de los mismos.

Por la técnica de recuento usada se produjo la constante manipulación de los cultivos, por lo que se consideró como un punto crítico durante el período de recuento, en el que se tuvo el cuidado de evitar contaminaciones indeseables, por el mismo hecho de que el medio no contenía ningún suplemento antimicrobiano, que evitara cualquier contaminación. Otro factor que afectó en el recuento, fué la aparición de parásitos muertos subsiguiente al día pico de máxima concentración haciendo más difícil la visualización en el campo microscópico para hacer los conteos de los parásitos vivos, sin embargo con mas atención y dedicación se logró hacer los conteos respectivos.

La caracterización de las diferentes cepas de *T. cruzi* realizada en este estudio comprobaron más la heterogeneidad de las mismas, mencionada por otros investigadores (1). En este estudio se realizó la caracterización de ocho aislamientos de *T. cruzi* provenientes de individuos infectados y de vectores, originarios de Santa María Ixhuatán, las que fueron comparadas con dos cepas nominales, la Y y la Tulahuén. La caracterización se basó en sus velocidades de multiplicación, densidad de crecimiento y curvas de concentración de parásitos. De acuerdo a los resultados del análisis de Varianza se encontró que los aislamientos guatemaltecos presentan curvas de concentración de parásitos diferentes entre sí.

Mediante una sencilla comparación de los promedios de los recuentos de cada cepa se encontró que los aislamientos SMIS-01, SMIS-04, SMIS-05, SMIS-07, DD7, DD14 y DD16 presentaron una concentración mayor de parásitos con respecto a las cepas controles mientras que el aislamiento DD15 presentó una concentración menor a las cepas controles, esto puede indicarnos que las cepas con mayor concentración de parásitos, posiblemente posean una mayor capacidad para multiplicarse y aumentar la cantidad de parásitos en el cultivo, mientras que el aislamiento DD15 posee una menor capacidad de multiplicarse produciendo de ésta manera una baja cantidad de parásitos. Lo cual podría indicar diferencias en el comportamiento de la infección en humanos.

Otro aspecto analizado en éste estudio fué la velocidad en que los parásitos se multiplican en cultivo *in vitro*, considerándose a la velocidad como el tiempo que necesita cada cepa para iniciar el aumento en el número de parásitos. Se observó que los resultados varían y que todos los aislamientos presentaron mayor velocidad frente a la cepa control Y y que seis de los aislamientos presentaron mayor velocidad frente a la cepa control Tulahuén, excepto los aislamientos, DD7 y DD15 que presentaron

una velocidad menor que Tulahuén y la cepa SMIS-07 presentó una velocidad mayor, mientras que SMIS-01 presentó una velocidad muy semejante a éste control. Estos resultados son variados y demuestran que algunas cepas son mas lentas en el proceso de inicio de su actividad multiplicativa.

De los aislamientos humanos caracterizados SMIS-01 fué el que presentó un pico mas alto en la concentración de parásitos durante el transcurso de la curva. Se observó que el número de parásitos aumentó en altas cantidades, alcanzando su pico máximo el día 18. Este mismo aislamiento al ser comparado con la cepa control Y y Tulahuén presentó una concentración de parásitos mucho mayor que éstos dos controles mientras que su velocidad de crecimiento fué muy semejante a la cepa Tulahuén pero mayor a Y, estas características hacen que SMIS-01 sea una cepa de importancia unido al hecho de que fué aislada de un paciente con infección activa.

Entre el grupo de los aislamientos de vectores, tenemos dos aislamientos con características especiales, uno de ellos el DD16, es el que presentó un pico más alto de parásitos pero a la vez presentó un marcado descenso en los siguientes cuatro días después del pico de la curva de crecimiento y al ser comparada con las cepas control Tulahuén presentó una velocidad menor y con respecto a la cepa control Y presentó una velocidad mayor.

Según las comparaciones realizadas entre las cepas se notó que existe un comportamiento diferencial entre los aislamientos de humanos y los de vectores, basado en la observación de que los aislamientos de humanos mostraron mayor concentración de parásitos y mayor o igual velocidad de multiplicación con respecto a los controles que los aislamientos de vectores. Por ello se considera que los aislamientos humanos presentaron mayor agresividad que los aislamientos de vectores, según éste estudio.

La caracterización morfométrica muestra también la heterogeneidad entre los distintos aislamientos debido a las diferencias que se encontraron con respecto a las medidas de longitud del cuerpo del parásito, mientras que respecto a la anchura del mismo no existe diferencia significativa ya que las medidas no variaron mas que en un micrómetro.

Por éstos datos se considera que la longitud es un parámetro útil de diferenciación. Respecto a las diferencias entre aislamientos de humano y de vector no se observaron diferencias definidas ya que entre algunos aislamientos de uno y otro grupo guardaron cierta similitud en las mediciones. No hay evidencias de estudios de morfometría comparativa efectuada en aislamientos guatemaltecos, con parásitos en fase de cultivo *in vitro* similares a los que se llevaron a cabo en el presente estudio.

Actualmente no existen publicaciones respecto al estudio de aislamientos de *T. cruzi* guatemaltecos en cultivos *in vitro* que nos permitan hacer comparaciones mas asociadas, sin embargo existen estudios de caracterización por curvas *in vivo* realizados por Rodas y Monroy los cuales presentan la heterogeneidad de los aislamientos, confirmando la heterogeneidad mostrada en el presente estudio (20).

La caracterización de *T. cruzi* mediante curvas de concentración de parásitos en cultivo constituye un instrumento de estudio y comparación de las cepas aisladas de diferentes fuentes y a la vez permite demostrar la heterogeneidad de las mismas. Esta heterogeneidad también nos hace referencia a las hipótesis existentes relacionadas con las diferencias en las manifestaciones clínicas de la enfermedad de Chagas (Por ejemplo gastrointestinales y cardiacas) asociadas a las diferencias en las características del parásito, tal como en éste estudio se pudo observar que algunos aislamientos presentaron un comportamiento más notable que otros (33).

Recientes investigaciones en poblaciones de *T. cruzi* han demostrado que presentan un alto grado de heterogeneidad en las respectivas subpoblaciones, cuyas diferencias dependen de clonaciones, como resultado de las amplificaciones de poblaciones de parásitos. Esas diferencias han sido identificadas en relación al rango de crecimiento de formas en cultivo, infectividad a hospederos invertebrados, virulencia y patogenicidad entre otros parámetros (1).

Esta información contribuirá al entendimiento de la enfermedad de Chagas y permitirá tomar las medidas mas adecuadas para su control.

X. CONCLUSIONES

1. Existe diferencia estadísticamente significativa entre las curvas de concentración de parásitos de las cepas aisladas de humano y de vector.
2. El aislamiento SMIS-01 presentó la mayor concentración de parásitos en la curva respecto a los demás aislamientos del estudio y a los controles.
3. El aislamiento DD15 presentó la menor concentración de parásitos en la curva respecto a los demás aislamientos del estudio y a los controles.
4. Entre los aislamientos de humano la cepa SMIS-07 fue la que más días tardó en alcanzar su pico de máxima concentración de parásitos.
5. Entre los aislamientos de *Triatoma dimidiata* la cepa DD15 fue la que más días tardó en alcanzar su pico de máxima concentración de parásitos.
6. La caracterización de *Trypanosoma cruzi* mediante curvas de concentración de parásitos en cultivo constituye un instrumento de estudio y comparación de las cepas aisladas de diferentes fuentes y a la vez permite demostrar la heterogeneidad de las mismas.
7. Existe diferencia significativa en las mediciones de longitud de los parásitos de los aislamientos del estudio, no así en la anchura de los mismos.

XI. RECOMENDACIONES

1. Realizar otros estudios de caracterización bioquímica de las cepas estudiadas.
2. Asociar los datos obtenidos en este estudio con los reportados con otras metodologías y con las formas clínicas reportadas.
3. Para lograr los resultados esperados es recomendable tener los conocimientos básicos respecto al uso de la campana de flujo laminar así como el correcto manejo de las pipetas estériles y la manipulación de los cultivos a fin de evitar cualquier contaminación indeseable.

XII. REFERENCIAS

1. WHO Technical Report Series. Control of Chagas Disease. Ginebra: Organización Mundial de la Salud, Doc. Tec. No. 811, 1991. 95p. (p. 6 - 10 - 30).
2. Sonnenwirth LJ. Métodos y Diagnóstico del Laboratorio Clínico. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana, vols.2, Vol 2, 1983. 2240p. (1906-1907).
3. Faust E, et. al. Parasitología Clínica . México: Editorial Salvat. 1974. 888p. (p.107-115)
4. Brown HW. Parasitology Clinical. 4a. ed. Folch FR,trad. México:Interamericana, 1977. (p.52-55).
5. Villanueva NJ. Prevalencia de Anticuerpos anti-*T. cruzi* en niños en edad escolar en el Municipio de Chiquimula. Guatemala: Universidad de San Carlos de Guatemala, (tesis de graduación Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia) 1994 . 52p.
6. Organización Panamericana de la Salud. Aspectos Clínicos de la Enfermedad de Chagas. Boletín de Sanidad de Panamá. 1974; 77(2): 141 - 155.
7. Scientific Working Group. Chagas Disease. U.S.A.: Fourth Scientific and Technical Advisory Committee, Doc. Tec. No. 6, 1982. 185p. (171-173).
8. Castellano EM. Prevalencia de la Enfermedad en un área de la Comunidad del área Endémica Estudio realizado en el caserío San Miguel del municipio Pueblo Nuevo Viñas, Santa Rosa de Octubre de 1992 a Marzo 1993".Guatemala: Universidad de San Carlos de Guatemala (tesis de graduación , Facultad de Ciencias Médicas) 1993. 49 p.

9. Sturm NR, et al. Sensitive Detection and Schizodeme Clasification of *Trypanosoma cruzi* Cell by Amplification of Kinetoplast Minicircle DNA Sequences: use in Diagnosis of Chagas disease. Mol. Biol. Par. 1989; 33:205-214.
10. Plorde J. Enfermedad de Chagas 1670 - 1672 . En Harrison Principios de Medicina Interna . México: McGraw-Hill, 1986. Vol XII 3088p.
11. Ayau CA. Enfermedad de Chagas Guatemala. Boletín Informativo del Colegio de Médicos y Cirujanos. Doc. Tec. No. 4. 1991. 12p. (p. 4)
12. Boletín Sanitario Panamericano. Situación de la Enfermedad de Chagas en Las Americas . 1984; 97 (2):159 - 165.
13. Gonzáles BL. Prevalencia de la Enfermedad de Chagas en Puerto Barrios, Izabal. Guatemala: Universidad de San Carlos de Guatemala, (tesis de graduación, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia) 1986. 53p.
14. Deneris J, Marshall NA. Biological Characterization of a strain of *Trypanosoma cruzi* Chagas isolated from a human case of trypanosomiasis in California. Am. J. Trop. Med. Hyg. 1989; 422 - 428.
15. Cosenza H. Caracterización de aislamientos de *T. cruzi* de Honduras . Memorias: Congreso de Enfermedades parasitarias de mayor prevalencia y transmitidas por vectores en Centroamérica. 1992.
16. Carneiro M, Romanha AJ, Chiari E. Biological Characterization of *Trypanosoma cruzi* Strains from different zymodemes and schizodemes . Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio Janeiro, 1991; 86:387 - 393.
17. WHO Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases. Report on a Meeting on the Feasibility of Analytical Epidemiological Studies on Chagas' Disease. Brazil : World Health Organization, Doc. Tec. No. 3, 1986, 7p. (p. 2 - 3).

18. Zavala JE, Castro OV, Hernández R. Molecular Characterization Of Mexican Stocks of *Trypanosoma cruzi* Using Total DNA. Am. J. Trop Hyg. 1992; 47(2):201-209.
19. Macedo AM, et al. DNA fingerprinting of *Trypanosoma cruzi* a new tool for characterization of strains and clones. Brazil:Universidad Federal de Minas Gerais. Mol. Biol. Parasit. 1992;55:447- 454.
20. Rodas AG. Caracterización biológica de cinco cepas guatemaltecas de *Trypanosoma cruzi* aisladas de *Triatoma dimidiata* y *Triatoma nitida*. Guatemala:Universidad de San carlos de Guatemala (tesis de graduación Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia) 1994. 44p.
21. Andrade SG Morphological and behavioural characterization of *Trypanosoma cruzi* strains. Rev. Soc. Bras. Med. Trop. 1985; 18:39 - 46.
22. McCabe R, et al. Ketoconazole Protects Against Infection whit *Trypanosoma cruzi* in a Murine Model. Am. Soc. Trop. Med. Hyg. 1987; 81:960-961.
23. Monroy M. Aislamientos y Caracterización de 4 cepas de *T. cruzi* del Oriente de Guatemala. Mem VIII Congreso Latinoamericano de Parasitología y Medicina Tropical Guatemala.1987. 266p (p.36).
24. Monroy M. Vectores de la Enfermedad de Chagas en Guatemala. Mem I Seminario Internacional de Enfermedades Tropicales, JICA. Guatemala 1992. 128p.
25. Wendel S, et al. Chagas Disease (American Trypanosomiasis) Its Impact on transfusion and Clinical Medicine ISBT Brazil 1992 São Paulo Brazil (p13- 27)

26. Boyes HR. Immunology of Chagas Disease. Public Health Service 1987 194:187-189.
27. Avila H, et al. Schizodeme Analysis of *Trypanosoma cruzi* stocks from South and Central America By Analysis of PCR-amplified Minicircle Variable Region Sequences. Mol. and Biol. Parasitol. 1990;42:175-188.
28. McDaniel JP, Dvorak JA. Identification, Isolation and Characterization of Naturally- occurring *Trypanosoma cruzi* Variants. Mol. and Bio. Parasitol. 1993; 57:213-222.
29. Castañeda M, Craig SP, Castro C. Genomic DNA sequence polymorphism of *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi* isolates with phenotypic variation. Comp. Biochem. Physiol. 1988; 707 -710.
30. Morel C, et al. Strains and clones of *Trypanosoma cruzi* can be characterized by pattern of restriction endonuclease products of kinetoplast DNA minicircles. Proc. Natl. Acad. Sci. 1980; 77: 6810 - 6814.
31. Andrade SG. Caracterizacao de cepas de *Trypanosoma cruzi* isoladas no reconcavo Baiano. Rev.Pat.Trop. S.Paulo 1974;18:140.
32. Andrade SG. Tentative for grouping different *Trypanosoma cruzi* strains in some types. Rev.Inst.Med.Trop.S.Paulo 1976;18:140.
33. WHO Progress in International Research. Tropical Disease. Geneva: UNDP/World Bank TDR, 1989. Organización Mundial de la Salud, 1989 (p. 84).
34. Koneman E. Diagnóstico Microbiológico 3 ed. Argentina: Editorial Médica Panamericana. 1992 .909p. (p.763-765).

ANEXOS

Tabla No. 1

**RESULTADOS GENERALES DE LA CARACTERIZACION DE
LOS AISLAMIENTOS**

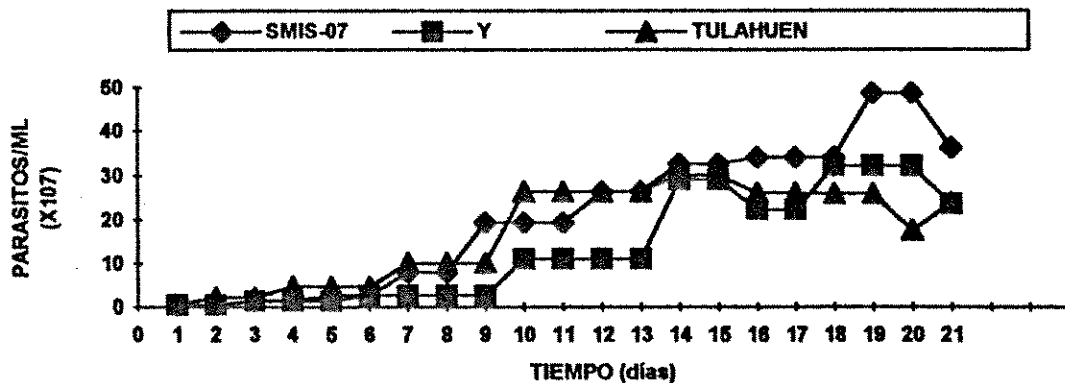
<i>NOMENCLATURA OMS</i>	<i>NOMBRE COMUN</i>	<i>MAXIMO CONTEO</i>	<i>DIAS MAYOR CONCENTRACION</i>	<i>DIÁ PICO</i>
MHOM/GT/93/SMIS-01	BRJ	4.89X10 ⁸	1 0 - 1 8	18
MHOM/GT/94/SMIS-04	H392	4.26X10 ⁸	0 9 - 1 6	14
MHOM/GT/94/SMIS-05	EOMO	4.73X10 ⁸	1 4 - 1 6	19
MHOM/GT/95/SMIS-07	H7	4.11X10 ⁸	1 6 - 2 1	14
ITD//GT/93/DD7	DD7	3.33X10 ⁸	1 0 - 1 8	14
ITD//GT/93/DD14	DD14	3.73X10 ⁸	0 9 - 1 4	10
ITD//GT/93/DD15	DD15	2.91X10 ⁸	1 8 - 2 1	18
ITD//GT/93/DD16	DD16	4.12X10 ⁸	0 8 - 1 1	10
TULAHUEN	T	3.01X10 ⁸	1 4 - 1 8	14
Y	Y	3.21X10 ⁸	1 0 - 1 4	18

Tabla No.5
MEDICIONES EN MICROMETROS DE LARGO DE EPIMASTIGOTE DE *T. cruzi*

No.	SMIS-01	SMIS-04	SMIS-05	SMIS-07	DD7	DD14	DD15	DD16	Y	T
1	26	21	22	22	25	24	23	31	20	29
2	26	21	24	25	24	27	26	27	22	29
3	29	22	24	25	24	26	29	30	22	29
4	31	21	23	23	24	22	27	34	22	29
5	31	20	25	22	29	25	24	33	22	29
6	28	23	23	26	26	22	22	29	25	30
7	26	21	23	23	29	22	24	35	24	29
8	28	22	22	23	24	22	24	34	24	31
9	28	20	24	23	24	22	28	32	25	31
10	31	21	23	23	28	23	25	36	26	30
11	28	21	24	23	21	24	26	27	22	28
12	31	20	23	25	21	24	26	29	25	26
13	29	23	25	26	25	23	23	30	23	30
14	29	20	26	25	25	25	29	29	25	32
15	29	20	26	23	22	22	28	29	25	30
16	29	21	25	25	21	22	28	29	23	30
17	29	24	26	25	24	26	25	29	26	30
18	29	21	28	28	24	24	24	30	23	30
19	22	24	26	25	25	23	26	30	22	32
20	26	24	24	22	25	23	25	31	22	30
21	28	21	23	27	26	26	24	31	25	28
22	28	23	24	23	24	29	28	32	25	32
23	26	23	27	23	24	29	25	35	24	28
24	26	23	27	25	23	25	26	31	22	31
25	33	22	24	26	26	25	27	37	23	30
26	31	20	25	28	24	23	26	34	23	32
27	31	21	22	24	24	24	30	31	23	29
28	31	18	27	27	26	22	26	30	23	32
29	29	20	24	25	24	28	28	30	21	31
30	29	21	25	23	22	25	26	31	21	29
31	31	20	27	22	22	28	26	33	24	33
32	29	22	23	25	23	24	22	29	25	27
33	24	23	24	25	27	24	22	26	25	29
34	26	22	25	26	25	22	24	32	25	32
35	26	22	22	26	21	25	24	32	23	30
36	26	22	26	24	24	23	23	29	28	28
37	29	19	24	24	26	25	24	31	25	29
38	24	23	27	24	24	26	25	31	26	29
39	28	21	25	24	26	22	24	30	26	29
40	29	21	26	22	23	27	23	31	39	32
41	33	22	27	33	24	27	21	30	25	31
42	29	23	25	26	23	26	23	30	23	30
43	28	21	26	26	23	23	22	30	25	32
44	31	21	25	24	22	25	24	30	24	33
45	29	22	26	26	24	25	26	30	24	29
46	31	22	26	26	23	23	26	26	25	29
47	29	23	24	24	25	22	25	27	25	29
48	31	21	26	26	25	22	25	28	26	30
49	31	23	23	23	23	24	25	28	23	29
50	28	22	26	26	24	25	26	28	26	30
X	28.58	21.54	24.7	24.78	24.28	24.3	25.16	30.56	24.2	28.86
σ	2.304	1.313	1.542	1.982	1.829	1.972	2.034	2.442	2.688	5.635

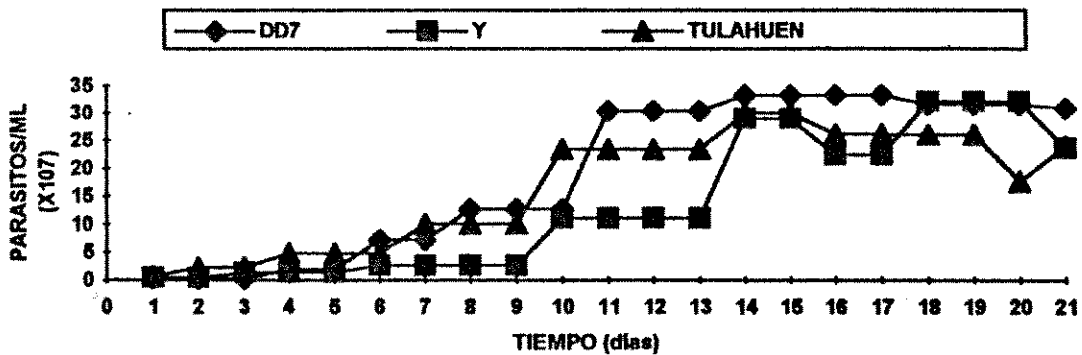
Gráfica No.2

COMPARACION DEL AISLAMIENTO SMIS-07 CON LAS CEPAS CONTROL.

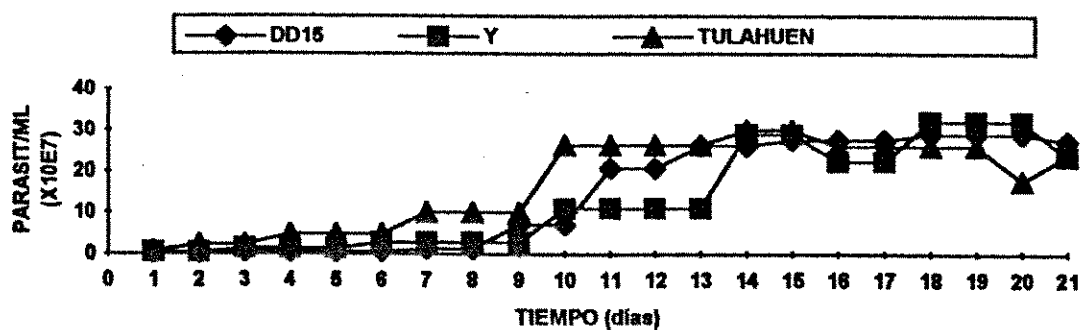


Gráfica No.3

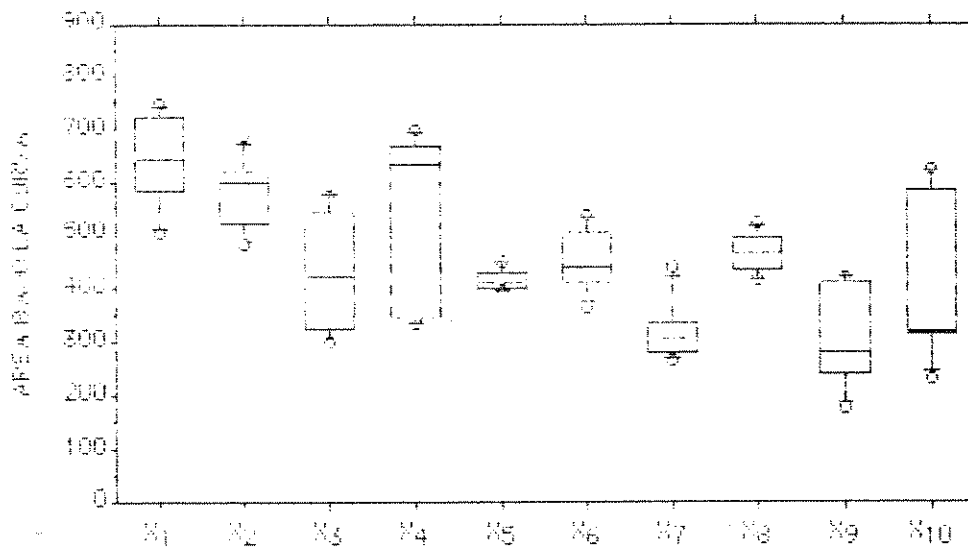
COMPARACION DEL AISLAMIENTO DD7 CON LAS CEPAS CONTROL.



Gráfica No. 4

**COMPARACION DEL AISLAMIENTO DD15 CON LAS
CEPAS CONTROL**

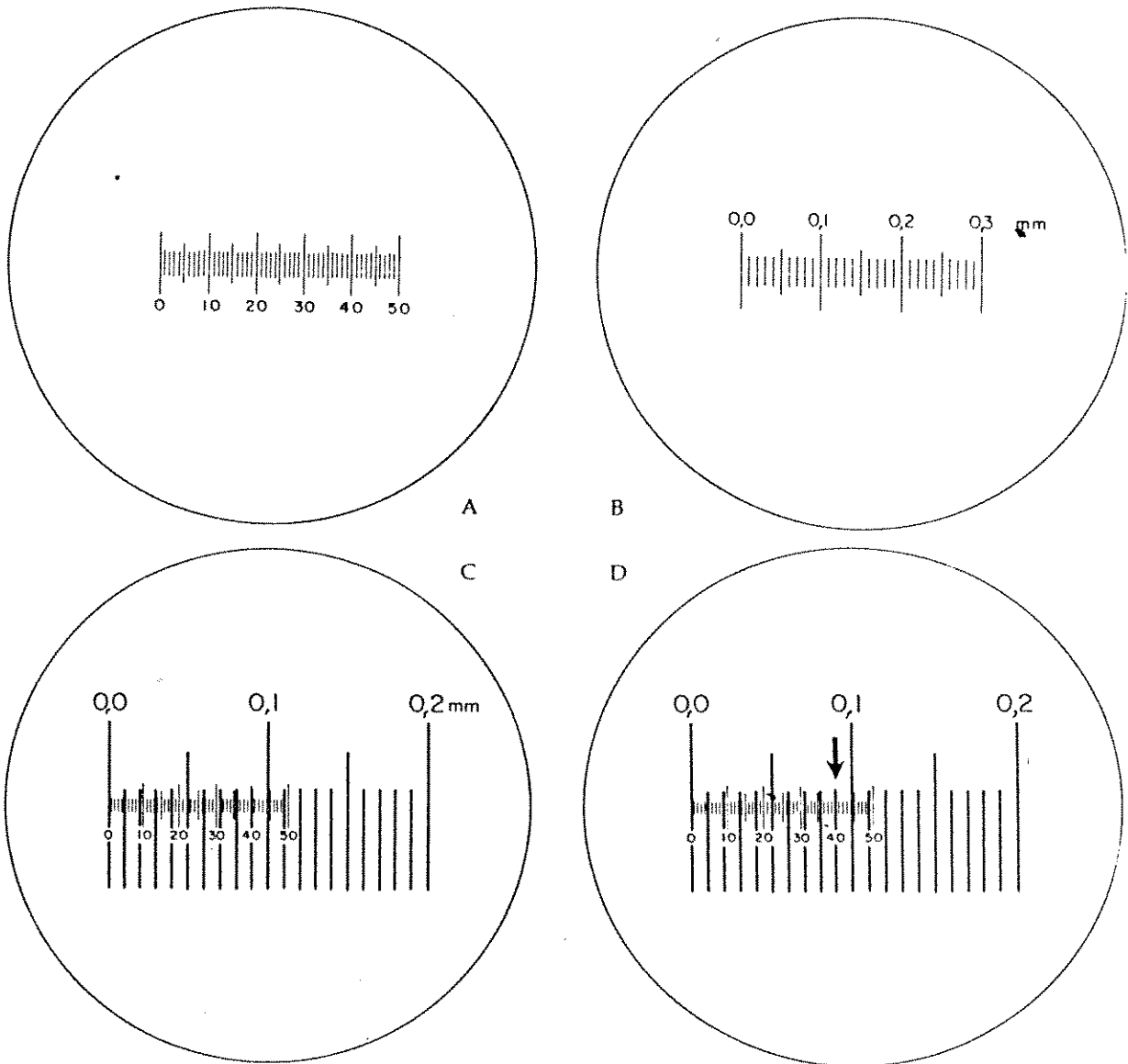
Grafica No. 5
COMPARACION GRAFICA DE LAS CURVAS DE CONCENTRACION DE
PARASITOS



Caja de Tuckey que muestra las diferencias significativas entre los aislamientos.

- X1: SMIS-01
- X2: SMIS-05
- X3: SMIS-07
- X4: SMIS-04
- X5: DD7
- X6: DD14
- X7: DD15
- X8: DD16
- X9: Y
- X10: TULAHUEN

Grafica No. 6



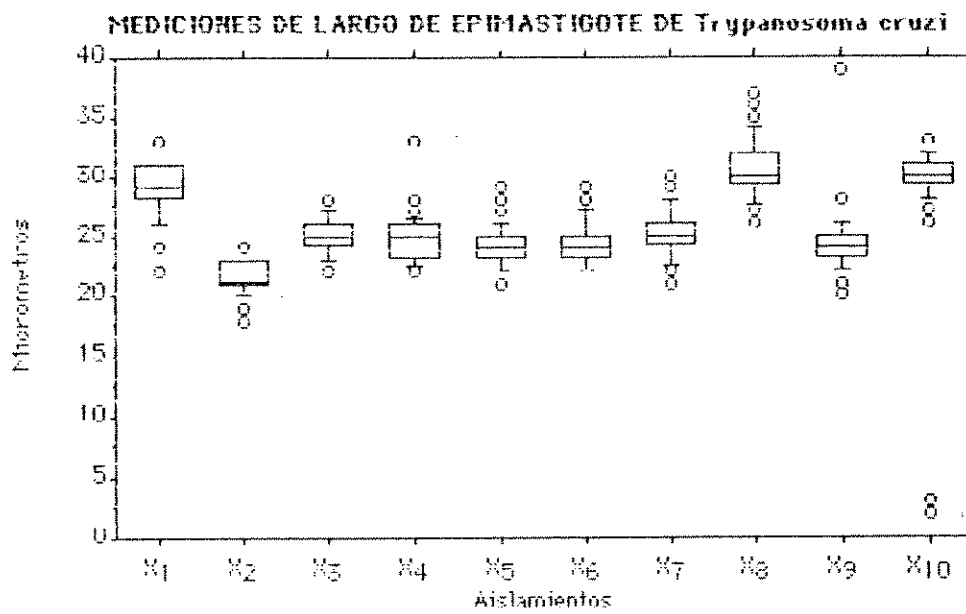
Ajustar el micrómetro de platina de modo que la línea 0 del micrómetro ocular se superponga con la línea 0,0 de la escala del micrómetro de platina. Cuando se observa con gran aumento (450 ×), la superposición de las dos escalas se ve como en la figura C.

Sin manipulación adicional, mirar a través de las dos escalas y encontrar el siguiente par de líneas que coincidan exactamente. En D (reproducción de la imagen obtenida con gran aumento, 450 ×) las líneas coincidentes están en la marca 40 sobre la escala ocular y en la marca de 0,09 mm en la escala del micrómetro de platina (flecha).

Tomado de : Koneman E. Diagnóstico Microbiológico 3a. ed. Argentina: Editorial Médica Panamericana. 1992. 909p. (p. 763-765).

Grafica No. 7


COMPARACION DE LAS MEDICIONES DE LA LONGITUD DE
EPIMASTIGOTES DE *T. cruzi*

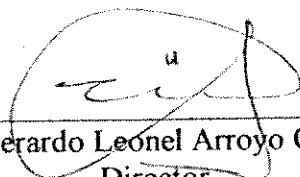


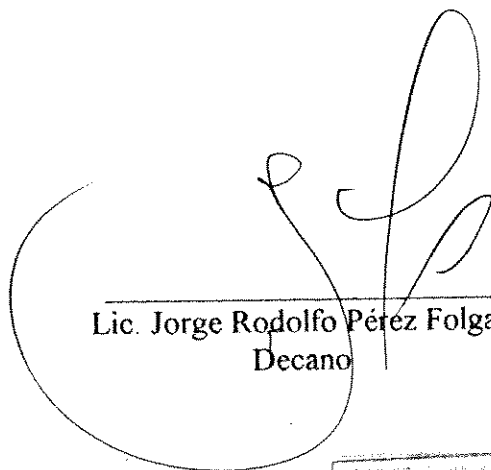
Caja de Tuckey que muestra las diferencias significativas entre los aislamientos

- X1: SMIS-01
- X2: SMIS-04
- X3: SMIS-05
- X4: SMIS-07
- X5: DD7
- X6: DD14
- X7: DD15
- X8: DD16
- X9: Y
- X10: TULAHUEN


Br. Dina Aracely Cruz Mérida.


Licda. Vivian Lucrecia Matta Ríos.
Asesora


Lic. Gerardo Leonel Arroyo Catalan
Director


Lic. Jorge Rodolfo Pérez Folgar
Decano