

**UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA**

**Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia**

**\* RELACION ENTRE EL GRADO DE PARASITEMIA DE DOS**

**CEPAS GUATEMALTECAS DE *Trypanosoma cruzi***



**Para obtener el título de**

**QUIMICO BILOGO**

**Guatemala, septiembre de 1996.**

PROPIEDAD DE LA UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA  
Biblioteca Central

DL

06

T(1753)

**JUNTA DIRECTIVA**  
**FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS Y FARMACIA**  
**UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA**

<b>DECANO</b>	<b>LIC. JORGE RODOLFO PEREZ FOLGAR</b>
<b>SECRETARIA</b>	<b>LICDA. ANA FORTUNY DE ARMAS</b>
<b>VOCAL I</b>	<b>LIC. MIGUEL ANGEL HERRERA GALVEZ</b>
<b>VOCAL II</b>	<b>LIC. GERARDO LEONEL ARROYO CATALAN</b>
<b>VOCAL III</b>	<b>LIC. RODRIGO HERRERA SAN JOSE</b>
<b>VOCAL IV</b>	<b>BR. ANA MARIA RODAS CARDONA</b>
<b>VOCAL V</b>	<b>BR. HAYRO OSWALDO GARCIA GARCIA</b>

## ACTO QUE DEDICO

- A Dios**                    **Infinitas gracias, porque mis estudios universitarios son obra de su voluntad.**
- A la Virgen María**       **Consuelo y refugio en mis penas y alegrías.**
- A Mis Padres**            **Florindo Hernández  
Edna de León de Hernández (Q.E.P.D.)  
Quienes con su amor, comprensión y sacrificio  
hicieron posible la culminación de mi carrera.**
- A Mi Hermana**           **Edna Judith Hernández (Q.E.P.D.)  
Quién me brindó su ejemplo, amor y comprensión.**
- A Las Familias**         **Marroquín Quevedo  
Morales Rosas  
Fortin Sánchez  
Por el apoyo brindado.**
- A Mis Abuelos**         **Romeo de León e Imelda Flores (Q.E.P.D.)  
Matías Hernández (Q.E.P.D.)  
Por su ayuda y amor constantes.**
- A Mis Hermanas**       **Maricela Oliva, Gladys de León, Margarita López de Poltan y Dorita Santos. Por su protección y guía constantes y por sus consejos oportunos.**
- A Mis Tías**              **Sor Lucía, Amparo, Natalia, Argentina, con mucho cariño.**
- A Mis Compañeros  
y amigos. En  
especial**                 **Licda. Lilita Videz, Jorge Barahona, Patricia, Liseth, Antonieta, Mildred, Remei, Nora, Mayra, Bosbely, Miguel, Ramon, Ernesto, Ileana, Sandra, Ligia, Rosa María, Carmen, Lourdes y Paulita (Q.E.P.D.), con un cariño muy especial.**

## **AGRADECIMIENTOS**

**Licda. Carlota Monroy; por su colaboración, asesoría y orientación, que me brindó para la elaboración del presente trabajo de investigación.**

**Lic. Federico Nave; por su valiosa asesoría estadística.**

**Dr. Edgar Martínez; por su ayuda en la realización de esta tesis.**

**Al Programa de E.D.C., especialmente al Laboratorio-Escuela, por los conocimientos impartidos durante mi formación profesional.**

**Licda. Mildred Mejía y Licda. Antonieta Rodas, por su colaboración durante la elaboración de este estudio.**

**A Gladys C. Lepe L., por su amistad, apoyo y ayuda incondicional durante todo el transcurso del presente trabajo.**

**Al departamento de Zoología de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia y la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad de San Carlos de Guatemala, por haberme brindado la oportunidad de realizar el presente trabajo de investigación.**

**A todas las personas e instituciones que de una u otra forma colaboraron en la realización de éste trabajo.**

## INDICE:

<b>I.</b>	<b>RESUMEN</b>	<b>01</b>
<b>II.</b>	<b>INTRODUCCION</b>	<b>02</b>
<b>III.</b>	<b>ANTECEDENTES</b>	<b>04</b>
	<b>A. Generalidades</b>	<b>04</b>
	<b>B. Historia</b>	<b>04</b>
	<b>C. Forma de transmisión</b>	<b>06</b>
	<b>D. Distribución geográfica</b>	<b>07</b>
	<b>E. Epidemiología</b>	<b>07</b>
	<b>F. Etiología</b>	<b>07</b>
	<b>G. Manifestaciones clínicas</b>	<b>10</b>
	<b>H. Otras características</b>	<b>12</b>
	<b>I. Métodos de diagnóstico</b>	<b>15</b>
	<b>J. Tratamiento</b>	<b>19</b>
<b>IV.</b>	<b>JUSTIFICACIONES</b>	<b>20</b>
<b>V.</b>	<b>OBJETIVOS</b>	<b>21</b>
<b>VI.</b>	<b>HIPOTESIS</b>	<b>22</b>
<b>VII.</b>	<b>MATERIALES Y METODOS</b>	<b>23</b>
<b>VIII.</b>	<b>RESULTADOS</b>	<b>30</b>
<b>IX.</b>	<b>DISCUSION DE RESULTADOS</b>	<b>32</b>
<b>X.</b>	<b>CONCLUSIONES</b>	<b>36</b>
<b>XI.</b>	<b>RECOMENDACIONES</b>	<b>37</b>
<b>XII.</b>	<b>REFERENCIAS</b>	<b>38</b>
<b>XIII.</b>	<b>ANEXOS</b>	<b>48</b>

## I. RESUMEN

El propósito de este estudio fue evaluar el tropismo tisular de dos cepas nativas de *Trypanosoma cruzi*, cuya parasitemia fuera distinta en sus picos máximos (MAR-6 y MAR-5, parasitemia alta  $7 \times 10^7$  y baja  $7 \times 10^5$  respectivamente).

Se usaron ratones como modelo experimental, los cuales se inocularon en 2 grupos de 65 con  $1 \times 10^4$  tripomastigotes/ml de cada una de las cepas a estudiar. Se evaluó la parasitemia a los 7, 14, 21, 28 y 32 días y sacrificándose en éstos mismos días los ratones para evaluar el tropismo tisular por medio de inmunofluorescencia indirecta.

Se usaron pruebas no paramétricas (Kruskal-Wallis y Friedman) para analizar la respuesta semi-cuantitativa y la respuesta cualitativa binomial se uso la prueba de Chi-cuadrado y Cochran.

El estudio semi-cuantitativo demostró que no hay diferencia significativa entre las cepas ( $p < 0.05$ ) las que presentaron un tropismo similar. Se puede concluir que a mayor parasitemia no necesariamente hay una mayor invasión de tejido. La respuesta cualitativa binomial, tuvo los mismos resultados que la semi-cuantitativa, pero demostró que sí hay diferencia significativa entre cepas y órganos (Cochran  $p < 0.05$ ) con respecto a la proporción de positivos y negativos, ya que el tiempo no interfiere siendo los órganos blancos más afectados músculo esquelético, corazón e hígado. El ciclo de invasión de tejidos difiere de otras cepas centroamericanas, ya que las cepas guatemaltecas invaden primero hígado y cerebro y posteriormente quedan infectados el corazón y músculo esquelético.

## II. INTRODUCCION

Guatemala es una área endémica de enfermedades producidas por protozoos, dentro de los cuales se tiene la Enfermedad de Chagas o Tripanosomiasis Americana que afecta cerca de 20 millones de personas en América Latina (1-4).

La enfermedad de Chagas se caracteriza por presentar un megasíndrome que incluye cardiomegalia y megacolon, provocada por la gran cantidad de complejos inmunes producidos por el hospedero como respuesta a la alta parasitemia de *T. cruzi*, sin embargo no todos estos eventos son clásicos de dicha enfermedad. Se han reportado casos de pacientes que no presentan este síndrome y no muestran sintomatología clínica alguna, siendo diagnosticados post-mortem como pacientes chagásicos. Esto pone de manifiesto la necesidad de una investigación más profunda ya que se calcula que la población de riesgo asciende a cerca de 100 millones de personas (5-8).

A pesar de todos los estudios realizados en nuestro país se desconoce aún el comportamiento de las cepas nativas de *T. cruzi*, por lo que se consideró necesario investigar y tratar de establecer como afectan dichas cepas a otros órganos de la economía tales como: cerebro, hígado, bazo, músculo y corazón.

Para ello, se usaron ratones albinos inoculados intra-peritonealmente con cepas nativas con altas y bajas parasitemias cuantificándose por el método rápido de Filardi (9).

La curva de parasitemia de *T. cruzi* obtenida de ratones, se relacionó con la invasión tisular de varios órganos a fin de profundizar en el conocimiento de la enfermedad.

Para la determinación del órgano blanco más afectado se usó la prueba de inmunofluorescencia indirecta (IFI) en cortes histológicos congelados.

Los resultados fueron analizados por regresión logística para buscar asociación entre las variables de interés en relación al tiempo. Se pudo demostrar que ambas cepas presentaron un tropismo similar en el estudio semicuantitativo, concluyéndose que no necesariamente a mayor

**parasitemia, hay una mayor invasión de tejidos.**

**La respuesta cualitativa binomial, demuestra que si hay diferencia entre cepas y órganos con respecto a positivos y negativos. Siendo los órganos blancos mas afectados el músculo esquelético, corazón e hígado. En la primera semana, las cepas (MAR-5 yMAR-6), invaden cerebro e hígado, para luego invadir el músculo esquelético y corazón. Mientras que en la fase terminal proliferan en el corazón.**

**Además las cepas se diferencian en la elección de órganos, ya que la MAR-6, cepa de alta parasitemia, muestra invasion a bazo, mientras que la MAR-5, cepa de baja parasitemia no lo invade.**



### III. ANTECEDENTES

#### A. Generalidades

La enfermedad de Chagas es una parasitosis exclusiva del continente americano, originalmente se inició como una enzootia afectando exclusivamente a los animales silvestres, siendo transmitida por insectos triatomíneos.

Con el transcurso del tiempo el hombre entró en contacto con los focos naturales alterando el equilibrio ecológico y facilitando la invasión domiciliar de los triatomíneos portadores de *Trypanosoma cruzi*, convirtiéndose entonces en una zoonosis en la que intervienen principalmente los animales domésticos y el hombre (1, 2).

La distribución de triatomíneos está restringida por factores como el clima, tipo de vivienda, etc., los cuales por sí solos no son capaces de actuar, pero en conjunto interfieren considerablemente en ello (3).

#### B. Historia

La enfermedad de Chagas fue descrita por primera vez el 9 de agosto de 1909 en Minas Gerais Brasil, por Carlos Chagas quien encontró en los techos de las viviendas, chinches que chupaban la sangre a los habitantes de las mismas (4). Al examinar estos insectos, él observó que estaban infectados con protozoos flagelados, cuando se inoculó la sangre de estos insectos en animales de experimentación se logró desarrollar una enfermedad aguda (1, 5).

En 1968 Köberle señaló que esta parasitosis exótica se había constituido en la plaga más frecuente y peligrosa del continente americano (8).

En Guatemala, la primera publicación referente a la existencia de tripanosomas en el país fue por el Doctor Rafael Morales, quien encontró *T. lewis* en algunos roedores en la ciudad capital (10).

La historia de la enfermedad de Chagas inicia en 1932, cuando Reichenow, del Instituto Tropical de Hamburgo, reportó los primeros casos en la finca "Las Viñas" localizada en el

departamento de Santa Rosa, donde obtuvo numerosos ejemplares e hizo cuidadosas observaciones de un redúvido que por sus características morfológicas supuso que se trataba de *Triatoma dimidiata* (10, 11).

El trabajo más abundante sobre la tripanosomiasis en Guatemala fué realizado por Romeo de León ya que en el período comprendido de 1942-58, publicó más de 14 trabajos científicos referentes a dicha enfermedad (1, 7, 12, 13). Además comprobó el tercer caso y luego informó otro caso con infección por un *Trypanosoma* morfológicamente diferente, al que llamó *T. guatemalensis*, que más tarde cayó en el sinonimia de *T. rangeli*. Al mismo tiempo señaló la importancia de *Rhodnius prolixus* como vector de dicho tripanosoma (7, 14).

En 1934 Blanco Salgado hizo un estudio de la distribución de los vectores hematófagos en Guatemala y señaló a *Triatoma dimidiata* y a *Rhodnius prolixus* como los transmisores de la enfermedad de Chagas en los departamentos de Jalapa, Chiquimula, El Progreso, Santa Rosa, Escuintla, Alta y Baja Verapaz, reportando que el 67 por ciento de redúvidos examinados se encontraban infectados (1, 7, 14).

En 1953 Peñalver informa de 20 nuevos casos humanos en Jutiapa y Santa Rosa, correspondiendo en un 85 por ciento a casos provocados por *T. cruzi*, 5 por ciento a *T. rangeli* y 10 por ciento a una infección mixta. Este mismo año estudió a 1631 personas, comprobando parasitológicamente a 59 enfermos, de los cuales 19 se localizaban en Jutiapa, 34 en Santa Rosa, 3 en Zacapa, 2 en Guatemala y 1 en Escuintla (15). Estos nuevos conocimientos motivaron las primeras acciones a nivel nacional por parte del gobierno, con el propósito de iniciar campañas de erradicación (1, 10, 11).

En 1963 Labé utilizó la prueba de Machado-Guerrelro para analizar un total de 339 muestras encontrando 27.4 por ciento de positividad (16).

En 1980 Pérez Martini informó que por medio de la prueba de anticuerpos fluorescentes (AF) contra *T. cruzi* encontró un porcentaje de positividad de 20 por ciento para Jutiapa, 16 por

ciento para Santa Rosa y 15 por ciento para Jalapa (7).

En 1983 Arriaza trabajó con niños de 7 a 15 años en los municipios de Olopa y Oratorio encontrando un 16 por ciento de positividad en ambas regiones, utilizando la prueba de hemaglutinación pasiva (17).

En 1984, Martínez y Sandoval trabajaron con pacientes de la consulta externa del Hospital Nacional de Cuilapa y el banco de sangre del hospital de Escuintla respectivamente, utilizando la prueba de Hemoaglutinación Pasiva (H.A.P.) encontrando un porcentaje de seropositividad de 15 por ciento para los primeros y 16 por ciento para los segundos (18). En ambos estudios se coincidió en que el mayor número de personas seropositiva provenían del área rural y oscilaban entre los 40 y 60 años de edad.

Así mismo se hizo notar que títulos menores o iguales a 1:64 deben ser confirmados con otros métodos. En el primer caso, el 9 por ciento de sueros reactivos se encontraban debajo o igual a 1:64 y el segundo únicamente el 2 por ciento se encontraba por arriba de este título (1, 19).

### C. Formas de transmisión

Existen tres tipos de ciclos de transmisión de *T. cruzi*. El ciclo doméstico que es mantenido por hombres y animales domésticos como perros, gatos y chinches domésticas (treatominae). El ciclo selvático que envuelve roedores, marsupiales, otros mamíferos y triatominos selváticos. Por último el ciclo peridoméstico que incluye mamíferos que se mueven libremente entre el campo y las casas, siendo los triatominos atraídos a las casas por la luz, necesidad de sangre o ambas (20, 21).

El ciclo doméstico es el que mantiene la infección en el área rural y periurbana. El vector se adapta bien a las viviendas de los humanos donde el humano y reservorios animales están en contacto. El vector vive y se multiplica en las grietas de las paredes, techos, debajo de la cama, detrás de los cuadros y en cajas que las personas usan como closets, éstos son transportados de

**casa en casa cuando las personas se movilizan (20-23).**

#### **D. Distribución geográfica**

**La enfermedad de Chagas o Tripanosomiasis Americana está limitada a la región de las Américas. La infección humana se encuentra distribuida exclusivamente desde México hasta Argentina, Chile y algunas islas del Caribe entre las latitudes 40 grados Norte y 45 grados Sur, como Trinidad y Tobago y Guyana (20). Sin embargo se ha encontrado que existen vectores y reservorios selváticos infectados en el sur de los Estados Unidos (24).**

#### **E. Epidemiología**

**La enfermedad de Chagas es una zoonosis propia de climas cálidos y húmedos. En zonas endémicas esta enfermedad ataca principalmente a niños en quienes se manifiesta como una enfermedad aguda y en adultos usualmente como afección crónica (7). La prevalencia de portadores de anticuerpos siempre aumenta con la edad, se encontró en Venezuela un 70 por ciento de portadores de anticuerpos en el grupo de edad mayor de 40 años (1, 7).**

**En cuanto al sexo parece ser que el hombre es más susceptible a esta enfermedad y en cuanto a la condición social, la enfermedad afecta principalmente a las clases humildes ya que los insectos viven en grietas y orificios de los techos y paredes de materiales como paja, palma y adobe, que son características de las viviendas de escasos recursos en áreas sub-urbanas y rurales y por las condiciones precarias de higiene (1, 7, 20).**

**Estimaciones hechas a partir de estudios seroepidemiológicos sugieren que en América existen 100,000 millones de individuos infectados y que 65 millones están expuestos al riesgo (20-25).**

#### **F. Etiología**

**El agente causal de la enfermedad de Chagas es un protozoo flagelado de la clase Mastigophora perteneciente al género *Trypanosoma* sub-género *Schizotrypanum*.**

**El género *Trypanosoma* incluye cientos de especies, todas parásitos de la sangre y la**

linfa en vertebrados e invertebrados. Identificar las especies es difícil ya que casi todas son idénticas. Las principales características que se toman como criterio de distinción son: distancia del núcleo respecto a la parte anterior y posterior del cuerpo del *Trypanosoma* y tamaño y la posición del cinetoplasto (7, 21-23).

El *T. cruzi* parasita la sangre y los tejidos del hombre, de los animales domésticos y salvajes. Afectando principalmente el corazón y el sistema nervioso (25-27).

Los tripanosomas que viven en la sangre usan la glucosa como fuente de energía a excepción del *T. cruzi*. Los niveles de lípidos, colesterol, fosfolípidos y ácidos grasos en presencia de tripanosomas son muy variables (25).

### 1. Morfología

El *T. cruzi* es un protozoo capaz de vivir y multiplicarse en el interior de varios tejidos de mamíferos, a través de sus formas amastigotas y de circular en la sangre de los animales en sus formas tripomastigotas (28).

El *T. cruzi* difiere de los otros tripanosomas, ya que posee una fase intracelular que involucra además del sistema linfocito-macrófago, células del miocardio, glándulas endocrinas y células gliales del cerebro (29).

Los amastigotes son organismos de forma esférica u ovalada de unos 2  $\mu$ m de diámetro que no posee flagelo, con núcleo grande y un cinetoplasto compuesto de cuerpo basal y representan una forma de multiplicación que se encuentra intracelularmente en los mamíferos hospederos, en esta fase la membrana ondulante y el flagelo desaparecen cuando el parásito penetra en la célula y entonces el organismo se multiplica por fisión binaria (28-31).

Los epimastigotes tienen el cinetoplasto situado delante del núcleo, un flagelo y una membrana ondulante corta, son organismos fusiformes de unos 20  $\mu$ m de longitud y representan la forma de multiplicación que se encuentra en el tubo digestivo del vector y en cultivos *in vitro* (30, 31).

Los tripomastigotes son la forma metacíclica infectiva, tienen el cinetoplásto situado detrás del núcleo y un flagelo, así como una membrana ondulante a lo largo del organismo, miden unos 20  $\mu\text{m}$  de largo y representan la forma infecciosa no multiplicativa, aparecen en la luz del recto de los reduvidos y son infecciosos para los mamíferos (32). También se encuentran en el mamífero hospedero donde transmiten la infección de una célula a otra o la inician en el reduvido cuando se ingieren con la sangre (31).

Los tripomastigotes del *T. cruzi*, pueden ser lisados por una sustancia extracelular producida por *Pseudomonas fluorescens*. Esta sustancia contiene proteínas y lipopolisacáridos; es resistente al calentamiento y a la congelación, no es proteolítica o hemolítica y no es inhibida por la tripsina (33).

## 2. Ciclo biológico del parásito

El *T. cruzi* se encuentra relacionado con un vector invertebrado que es un insecto triatomíneo de la familia *Reduviidae*, conocido comúnmente con el nombre de "Chupa sangre", "barbeiro", "chinche" o "telepates" y además un hospedero vertebrado que puede ser el hombre, perro, gato, roedores y otros mamíferos domésticos y silvestres (30, 32). El ciclo de vida se inicia con la picadura de un vector infectado; los tripanosomas metacíclicos son defecados por el vector al mismo tiempo que pica a un hospedero a través de la piel o de la conjuntiva ocular y otras mucosas. De esta forma el hospedero al rascarse introduce las heces con los tripanosomas, los cuales son englobados por los histiocitos e invaden rápidamente los fibroblastos, las células adiposas del tejido subcutáneo y fibras musculares situadas debajo del lugar de inoculación, así como varios órganos y tejidos (bazo, hígado, médula ósea, riñones, tejido nervioso, ganglios linfáticos y músculo estriado del corazón) (34). En término de tres días se multiplican y es en esta forma como se encuentran intracelularmente en el hombre. Cuando hay grandes cantidades de amastigotes las células se rompen y salen al torrente sanguíneo en forma de tripanosomas produciendo picos febriles. Si en este momento un vector no infectado

pica al hospedero adquiere el tripanosoma el cual permanece en el estómago del insecto durante 8 a 10 días. A partir de este tiempo los triatomas se vuelven infectivos, ya que pasan al intestino y luego al recto, donde existe un saco esferoide lleno de líquido amarillento donde se depositan en gran número los tripanosomas metacíclicos infectivos (30).

Cuando este nuevo vector infectado pica, defeca en una persona sana y se vuelve a repetir el ciclo (7, 21).

Los tripanosomas sufren cambios a lo largo del tubo digestivo del vector, dando lugar a formas infectivas en el intestino posterior del mismo (7). El fenómeno de evolución ocurre en tres etapas: estomacal, intestinal o duodenal e intestinal posterior.

En la primera la evolución es poco acentuada principiando a emigrar el blefaroplasto hacia la parte anterior del organismo, la segunda etapa se transforma en critídea cuya existencia en el duodeno se mantiene por toda la vida del insecto. Algunos autores afirman que se transforman en leishmania en el intestino medio (3). En la tercera etapa las leptomonas se transforman a formas metacíclicas (1).

#### G. Manifestaciones clínicas

Las manifestaciones clínicas en el hombre con infección de *T. cruzi* dependen principalmente de variaciones intraespecíficas del parásito y la respuesta inmunitaria del hospedero (34).

La lesión inicial de la tripanosomiasis es el "chagoma", la cual es una infiltración de polimorfonucleares, monocitos, linfocitos e histiocitos. Se manifiesta de 2 a 5 días después de la picadura, dolorosa a la palpación y edematización de la región. Si el edema es en el ojo se le llama signo de Romaña el cual puede ser uni o bi-palpebral (7, 29).

La enfermedad de Chagas evoluciona en 3 fases: fase aguda, fase latente o indeterminada y fase crónica (29, 35).

## **1. Fase aguda**

Se observa frecuentemente en niños, aunque también se puede observar en adultos, dura de 20 a 30 días, fiebre entre 38 y 38.5 °C durante la primera y segunda semana o sea al inicio de la septicemia (7). El período de incubación se establece al cuarto o quinto día después de la inoculación del tripomastigote metacíclico por medio de las heces de los insectos. En casos de transmisión por transfusión el período de incubación es más largo, dura de 20 a 40 días (32).

Los principales síntomas notificados en niños y jóvenes son fiebre moderada y síndrome oftalmoglandular (signo de Romaña), dilatación del saco lagrimal sin secreción de mucosas y tumefacción de los ganglios linfáticos preauriculares, taquicardia, hepatoesplenomegalia, adenitis de variada localización y se presenta una leucocitosis moderada con aumento de monocitos y/o linfocitos (29).

En algunos pacientes hay exantema cutáneo eritematoso, morbiliforme o maculopapular, el pulso suele ser rápido y regular, en casos graves puede haber notable dilatación cardíaca, ritmo de galope y signos de insuficiencia cardíaca, aproximadamente la mitad de los pacientes presentan anomalías electrocardiográficas, por lo común prolongación del intervalo P-R, bajo voltaje de QRS y alteraciones primarias de la onda T (36). Todos los síntomas, aún los más graves, desaparecen después de 2 a 5 meses de la infección, generalmente en forma espontánea (34). Si esto no ocurre sobreviene la muerte en algunos casos, o bien de 2 a 4 semanas la enfermedad pasa a ser crónica. En Brasil se realizó un estudio con 180 pacientes en fase aguda, 21 fueron mortales, 11 pasaron a ser crónicos y el resto sanaron aparentemente en forma espontánea (37). En los casos fatales, la autopsia reveló miocarditis aguda con *T. cruzi* (38-43).

## **2. Fase Latente o Indeterminada**

En esta fase puede permanecer de 10 a 20 años o toda la vida sin tener signos



clínicos, radiológicos o electrocardiográficos. Estos pacientes tienen las pruebas serológicas positivas como único signo de la enfermedad y en ocasiones el parásito puede obtenerse de su sangre; en realidad, ésta es la situación frecuente en las regiones endémicas.

También es llamada Forma laboratorial o sub-aguda (38, 40-43).

### 3. Fase Crónica

Las manifestaciones crónicas de la infección por *T. cruzi* se deben principalmente a la afección cardíaca y digestiva, aunque se pueden encontrar alteraciones del sistema nervioso tales como síndrome cerebeloso, convulsiones y trastornos de la personalidad. Estas alteraciones son comunes en adultos y los síntomas están íntimamente relacionados con el daño sufrido durante la fase aguda. Aproximadamente el 20 a 40 por ciento de los pacientes con afección crónica por *T. cruzi* en una región endémica muestran pruebas de lesión crónica del corazón, siendo el compromiso cardíaco el más frecuente e importante. Al examen clínico el paciente muestra hipotensión arterial, irregularidad del pulso, cardiomegalia, soplos de insuficiencia valvular tanto mitral como tricúspide y desdoblamiento fijo del segundo ruido; cuando este último signo se encuentra en individuos pertenecientes a zonas endémicas, representa un signo importante sugestivo de la infección chagásica (7, 27, 34, 41-45).

El megaesófago y el megacolon son manifestaciones importantes de la infección crónica por *T. cruzi*. Los pacientes con megaesófago se quejan de disfagia progresiva de larga duración, regurgitación, molestia retrosternal y a veces, de ataques paroxísticos de tos nocturna, estas dos manifestaciones no se han observado en Centro América. El megacolon se caracteriza por estreñimiento grave persistente de muchos años de duración, la frecuencia de impacto fecal y vólvulo con oclusión intestinal es alta en regiones donde la enfermedad de Chagas es endémica (7, 32, 44, 46).

#### H. Otras Características (*T. cruzi*)

Los diferentes estudios entre las cepas de *T. cruzi* se basan en las características

como virulencia y patogenidad, tropismo tisular y morfología del parásito en sangre periférica. Así también nuevos aspectos buscan probar criterios para la diferenciación de cepas como composición antigénica del parásito, modelo enzimático y caracterización del ADN del cinetoplasto (47-49).

Estudios experimentales muestran que las diferentes cepas de *T. cruzi* pueden evidenciar lesiones tisulares en su fase aguda y tropismo predominante de diferentes cepas a células de mamíferos (macrófagos, músculo cardíaco y muscular) (47).

Distintas cepas pueden presentar diferentes reacciones celulares y respuestas inmunológicas, que dependen en parte de su genética (50).

La virulencia es la capacidad del parásito de causar daño en menor o mayor grado. Patológicamente el carácter intrínseco está relacionado con la habilidad de producir lesión en el tejido y mortalidad. Las cepas altamente virulentas (Y y Peruana) son altamente patógenas, mientras otras son de baja multiplicación y baja virulencia causando lesiones leves (Cepa Colombiana) (50-52).

#### 1. Curvas de Parasitemias

A nivel centroamericano se han estudiado cepas de Honduras y Panamá; la cepa panameña mostró una parasitemia baja pero permanece por 90 días después de la infección (53).

En Honduras se estudiaron 5 cepas, de las cuales 3 tienen alta, 1 intermedia y 1 baja, la morbilidad fue de 100 por ciento para tres cepas y 2 cepas no eran letales (54).

Andrade, Schlempler y col. realizaron estudios de cepas de *T. cruzi* de Brasil y las clasificaron en 3 tipos de acuerdo a parámetros biológicos (55):

- a. Baja Virulencia (parasitemias arriba de 100,000 parásitos/ml) con puntos máximos de 20-40 días sin morbilidad.
- b. Virulencia intermedia (parasitemias arriba de 600,000 parásitos/ml) con puntos máximos de 15-25 días con baja morbilidad.

- c. **Alta virulencia (parasitemia arriba de  $2 \times 10^4$  parásitos/ml) por 10 días con períodos cortos de 6-12 días y 100 por ciento de morbilidad.**

## **2. Tropismo Tisular**

El tropismo tisular es uno de los aspectos más importantes para distinguir cepas de *T. cruzi*. Según Godines existen cepas con distintas células blanco y describió el tropismo reticular y del miocardio en cepas aisladas de cerdo y perro (56). Andrade y Andrade describieron lesiones histopatológicas de cepas Y (reticular) y Colombiana (Miocárdica) demostrando que ambas cepas tenían un tropismo natural cuando las defensas inmunológicas del hospedero fueron disminuídas con la administración de corticoides (55).

El tropismo del miocardio fue detectado por Gollard en cepas mexicanas y Andrade en algunas cepas de Reconcavo Balano (Bahía-Brazil) (57).

Melo y Brens estudiaron el tropismo de 4 cepas de *T. cruzi* y enfatizaron el tropismo a macrófagos de las cepas Y y Beremic (58).

Campos describió el neurotropismo de nervios ganglionares, así como del Plexo de Auerbach. Durante la fase aguda de la enfermedad de Chagas, pudo detectar un parasitismo preferencial de los nervios gllares (células satélite y neuronas), con un proceso inflamatorio y destrucción neuronal en ratones infectados con cepas Y de *T. cruzi*. Durante su fase crónica se observó una reducción significativa en el número de células neuronales en animales infectados con la cepa Y pero no con la cepa Colombiana (59).

En Centroamérica únicamente en Panamá se han realizado estudios de tropismo de cepas nativas, teniendo tropismo en músculo esquelético y corazón, mientras que en el cerebro tuvo un tropismo bajo en la etapa terminal (53, 54).

## **3. Tipificación de cepas de *T. cruzi***

Para determinar la virulencia de las cepas, se usaron parámetros como evolución de la infección, curvas de parasitemia, morfología del parásito en sangre periférica, tropismo tisular,

**lesiones histopatológicas y mortalidad en ratón (47, 51, 52, 57-60).**

**Basadas en las consideraciones anteriores las diferentes cepas de *T. cruzi* pueden dividirse en 3 tipos de acuerdo a la distribución de las cepas patrón:**

**a. Tipo I**

**Cepas con rangos rápidos de multiplicación con una parasitemia máxima y una mortalidad de 7 a 12 días de infección, con predominio de formas delgadas y macrofagotropismo en la fase temprana de la infección. Inmunológicamente pueden ser aglutinadas y lisadas con antisueros homólogos y heterólogos.**

**Prototipo: Cepa Peruana y Y (47, 51, 61-65).**

**b. Tipo II**

**Cepas con multiplicación relativamente baja, con picos irregulares de parasitemia, de 12 a 20 días de infección, con predominio de formas anchas y un porcentaje bajo de formas delgadas en la fase inicial, tropismo miocárdico. Inmunológicamente los tripomastigotes no son aglutinados con antisueros homólogos y heterólogos.**

**Prototipo: Cepas 12 St (Estado de Bahía, San Felipe) (47, 61-65).**

**c. Tipo III**

**Multiplicación baja con parasitemia baja y picos altos (20 a 30 días de la infección), rangos bajos de mortalidad hasta el 50vo día de infección, predominio de formas anchas en todo el curso de la infección y tropismo miocárdico y músculo esquelético. Inmunológicamente los tripomastigotes son parcialmente aglutinados con antisueros.**

**Prototipo: Cepa Colombiana (47, 61-65).**

**I. Métodos de Diagnóstico**

**El diagnóstico de la enfermedad de Chagas se basa en el laboratorio ya que los hallazgos clínicos son poco específicos (66). El criterio diagnóstico debe incluir: antecedentes epidemiológicos, datos clínicos, electrocardiogramas anormales, serología y**

parasitología positivas. El diagnóstico es establecido por el hallazgo de tripanosomas circulantes en sangre periférica, por lo que los métodos de elección son los parasitológicos. Los parásitos se encuentran en la sangre a partir de la segunda semana de la infección (67).

Los métodos más usados en el laboratorio son preparación en fresco, frote de sangre con coloración de Giemsa (gota gruesa) y Xenodiagnóstico (67).

Entre las variables que afectan la sensibilidad del método están el número de chinches utilizadas, estadio evolutivo de las mismas, existencia de realimentación, plazo y técnica de lectura, etc. De esta manera se ha demostrado la presencia del parásito en un 100 por ciento de los infectados en ésta etapa aguda y en el 50 por ciento de los pacientes en etapa crónica (13).

El diagnóstico de la fase crónica se establece por métodos serológicos tales como fijación del complemento, el cual constituye un método muy valioso para el diagnóstico de *T. cruzi*, sobre todo en infecciones crónicas relativamente ocultas. Fué desarrollado originalmente por Guerrero y Machado, quienes obtuvieron antígeno de un extracto acuoso de los bazos de cachorros infectados experimentalmente y desarrollaron la prueba por la técnica habitual (68). Kelssen refinó el procedimiento obteniendo antígeno de organismos cultivados (67, 69).

La hemaglutinación directa e indirecta, fué demostrada experimentalmente por Packchanian en 1949 y Senejkie es altamente específica, y es el procedimiento más usado en infecciones humanas (70, 71). Se han utilizado reacciones intradérmicas, donde se emplea el antígeno concentrado de *T. cruzi* y puesto en fenol al 0.5 por ciento en solución fisiológica, observándose una reacción local específica que alcanza su climax en 48 horas (72).

La técnica de anticuerpos por el método fluorescente es sencilla y rápida para el diagnóstico de tripanosomiasis, se utilizan tripanosomas en frotis de sangre con antígeno y fue descrita por Sadun y col. (73, 74). Se presentan reacciones cruzadas con sueros de pacientes con otras especies de tripanosomas y relativamente muy pocos con sueros de pacientes con otras enfermedades lo que demuestra su alto grado de especificidad (75).

Toussaint y colaboradores desarrollaron la técnica de antígeno soluble-anticuerpo fluorescente que también es altamente específica y tiene ventajas sobre las pruebas indirectas de organismo completo-anticuerpo fluorescente (76).

Además de los anteriores métodos pueden ser utilizados contraelectroforesis, contrainmunolectroforesis, aglutinación de látex, aglutinación directa, ELISA, etc. Cada una de éstas pruebas con diferentes grados de sensibilidad y especificidad a *T. cruzi* (7, 67).

El simposio Internacional de la OPS (Organización Panamericana de la salud) realizó una evaluación de los diferentes procedimientos serológicos en grupos de pacientes que presentaron xenodiagnóstico positivo, encontró que la prueba de fijación del complemento (FC) y de anticuerpos fluorescentes (AF) presenta la mayor sensibilidad, y que la AF presenta una positividad temprana por lo que es útil para el diagnóstico precoz de la enfermedad. La inadecuada preparación de reactivos ocasiona fallas en su sensibilidad y se obtienen reacciones cruzadas con *Leishmania sp* (28).

El procedimiento de hemaglutinación (HA) ha sido reconocido como sensible y específico fácil de reproducir y de alta confiabilidad como prueba de tamizaje (28). Su alta sensibilidad da un índice de copositividad de 0.995 y un índice de negatividad de 0.989 con la prueba de fijación del complemento, por lo que a HA se le otorgó alta sensibilidad (28).

El Ministerio de Bienestar Social de Salud Pública de la Argentina, estudió en 1972 la sensibilidad de tres métodos serológicos Fijación del complemento (FC), hemaglutinación (HA), anticuerpos fluorescentes (AF).

Se trabajó con un grupo de pacientes en la fase aguda de la enfermedad de Chagas sin tratamiento durante tres años de evolución, evaluándose la sensibilidad y duración de la etapa pre-serológica de la enfermedad para cada uno de los métodos. Los resultados obtenidos fueron los siguientes: La prueba de FC presentó una positividad inicial del 35 por ciento llegando rápidamente hasta 71.9 por ciento en el segundo mes, a 83.3 por ciento en el tercer mes y al 100

por ciento en el quinto mes, su sensibilidad estudiada hasta los 24 meses se mantuvo en un 95 por ciento. La de AF mostró una positividad inicial del día cero sorprendentemente sorprendentemente elevada de 72.1 por ciento, al mes de 97.1 por ciento y a partir del cuarto mes subió al 100 por ciento, valor que se mantuvo hasta los dos años de observación. Se concluyó que la prueba de AF es el método serológico que permite el diagnóstico precoz de la enfermedad y que HA presentó sensibilidad de 95 por ciento. En resumen se puede decir que la primera reacción en mostrarse positiva es AF con 100 por ciento de sensibilidad, luego FC y finalmente HA (13).

En lo referente a antígenos, se ha usado una amplia variedad entre ellos: corpusculares solubles, endo o exoantígenos, superficiales o somáticos. De los antígenos solubles se han "purificado" sustancias protéicas y polisacáridos. Actualmente se están fraccionando antígenos protéicos libres de polisacáridos para usarlos como antígenos de diagnóstico. Muy pocos de éstos antígenos han sido evaluados respecto a su sensibilidad en casos agudos o crónicos y su especificidad en casos no infectados por *T. cruzi*. La experiencia enseña que con la purificación de antígenos se logra mayor especificidad a expensas de menor sensibilidad (7).

En relación a los anticuerpos contra *T. cruzi* las inmunoglobulinas del tipo IgG, son las responsables de las reacciones en la gran mayoría de los procedimientos serológicos (77).

No se ha encontrado aumento de las IgM en el estado crónico de la enfermedad de Chagas, muy al contrario de la infección tripanosómica africana (75).

La determinación de las macro-globulinas (IgM) tiene importancia para comprobar infecciones chagásicas recientes y para Chagas congénito (77).

El diagnóstico histológico se basa en las diferencias en cuanto a composición, densidad de células, tejido conectivo y contenido de grasa, la temperatura óptima para los cortes en criostato varía según el tejido. Al respecto los tejidos animales se pueden clasificar en tres

grupos: 1) cerebro, gánglios linfáticos, hígado, bazo, riñón, testículo, legrados de útero, tumores celulares blandos y tiroides, se cortan mejor entre -5 y -15 °C; 2) músculo, tejido mamario conectivo, páncreas, útero y cuello uterino, piel (sin grasa), tejido mamario o graso, ovario, próstata, lengua e intestino, con los cuales hay que trabajar entre -15 y -35 °C; 3) Tejido graso, incluyendo la piel y el tejido subcutáneo, mamas, tejido adiposo y epiplón, en cuyo caso las secciones se harán entre -35 y -60 °C (78, 79).

#### **J. Tratamiento**

Se han utilizado eficientemente dos drogas para el tratamiento específico de la enfermedad de Chagas. Estos compuestos son Nitrofurtilmox, que es un derivado de furilideno-5-Nitrofur; y Benzodiazole que es un derivado de 2-Nitroimidazoles (80-85).

El Nitrofurtilmox, ha demostrado ser efectivo tanto *in vitro* como *in vivo* sobre las formas amastigotas y epimastigotas del parásito (86). No se sabe con certeza como actúa pero se piensa que inhibe las mitocondrias y por ende la respiración oxidativa; parece que actúa a través de la generación del anión superóxido y la producción de peróxido de hidrógeno inducido por el radical de la droga (86-88).

Entre el 40-70 por ciento de los pacientes presentan síntomas secundarios sobre el sistema nervioso central y tracto gastrointestinal, como irritabilidad, insomnio, convulsiones, náuseas, dolor abdominal y vómitos, que desaparecen al discontinuar la droga (85, 88).

El Benzodiazole es un derivado del 2-nitroimidazólico, actúa inhibiendo la síntesis de proteínas y del RNA del parásito, (79-85). Los pacientes tratados con ésta droga pueden presentar polineuropatías, eritemas multiforme o granulocitopenia (86).

Estas dos drogas, han demostrado ser efectivas en la eliminación de los síntomas y en la negativización de la parasitemia y serología (86, 87).



#### **IV. JUSTIFICACION**

**Las investigaciones realizadas en nuestro país son casi todas de carácter epidemiológico y no se encuentran estudios de cepas nativas que ayuden a establecer características antigénicas y conocer el tropismo tisular de cepas de *T. cruzi*. A nivel americano se han realizado investigaciones en México, Honduras, Panamá, Colombia y Brasil, presentando las cepas distintos tropismos.**

**Estos estudios han revelado que en las cepas de Sur-américa se observa más un tropismo a nivel de megaesófago y megacolon, no así en la cepas centroamericanas, especialmente la panameña, en donde se ha observado que presentan un tropismo muscular, especialmente el cardíaco, lo cual puede deberse a la afinidad celular del parásito.**

**Al no existir ningún tipo de estudio de las cepas guatemaltecas sobre el tropismo, se realizó este trabajo para ayudar a reconocer y confirmar la información de la afinidad celular que presenta el parásito hacia determinado órgano y relacionarlo con los síntomas que se observan en la fase aguda.**

## V. OBJETIVOS

1. Conocer el comportamiento de dos cepas guatemaltecas de *T. cruzi* en su tropismo tisular.
2. Conocer cuales son los órganos (corazón, hígado, bazo, cerebro y músculo esquelético) más afectados en ratones infectados con dos cepas guatemaltecas de *T. cruzi*.
3. Relacionar los picos altos y los bajos de parasitemias con la afección en órgano blanco en ratón infectado con *T. cruzi*.

## **VI. HIPOTESIS**

**Existe una asociación entre los picos altos y bajos de parasitemia con la invasión tisular (tropismo) del parásito en algunos órganos (corazón, hígado, bazo, cerebro y músculo).**

## VII. MATERIALES Y METODOS

### A. Universo de Trabajo

Se utilizaron ratones albinos de ambos sexos (6 a 7 semanas de edad) los que fueron inoculados artificialmente con 0.1 ml de las cepas guatemaltecas de *T. cruzi* ITD-GT/92/MAR-6 (CEPA I, parasitemia alta  $7 \times 10^7$ ) y ITD-GT/92/MAR-5 (CEPA II, parasitemia baja  $7 \times 10^5$ ), clasificadas según criterios de UNDP/World Bank/WHO, Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases on Standardization on Methods for *T. cruzi* Clasification (89).

Estas cepas fueron extraídas de ampolla rectal de *T. dimidiata*. Las chinches fueron recolectadas en Villa Canales por Rodas (90). Analizándose los órganos (cerebro, bazo, hígado, músculo esquelético y corazón) para la observación de tropismo.

Las cepas de estudio se inocularon de cada una 0.1 ml a ratones albinos de 6 a 7 semanas y con un peso entre 25 a 30 gramos.

Las curvas de parasitemia fueron establecidas inoculando por via intraperitoneal 0.1 ml que contenía  $1 \times 10^4$  tripomastigotes sanguíneos por animal en grupos de 4-8 ratones de 4 semanas de edad. Los ratones infectados se observaron en días alternos, sangrándolos de la cola y contando el número de tripomastigotes en 5 microlitros de sangre (91).

### B. Recursos

#### 1. Humanos

Investigador: Br. Jorge Mario Hernández de León

Asesor: MSc. Carlota Monroy.

#### 2. Institucionales

Universidad de San Carlos de Guatemala.

Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia.

Escuela de Biología.

Facultad de Ciencias Médicas, Departamento de Histología.

**Hospital General San Juan de Dios, Laboratorio Clínico,**

**Sección de Inmunología.**

**Hospital de Cancerología.**

**C. Materiales**

**1. Cristalería**

**Porta objetos.**

**Cubre objetos.**

**Varilla de vidrio.**

**Frascos grandes de vidrio con tapadera de rosca.**

**Cortes histológicos de los órganos de estudio (cerebro, hígado, bazo, corazón y músculo esquelético).**

**2. Reactivos**

**Agua destilada.**

**Tissue-Tek O.C.T. 4583 (medio de embebido de tejidos).**

**Formol al 40 por ciento.**

**Cloro.**

**Solución salina al 0.85 por ciento.**

**Alcohol.**

**Solución buferada de fosfatos (P.B.S.).**

**Aceite de Inmersión.**

**Concentrado para ratones.**

**Eter.**

**Set para inmunofluorescencia.**

**Antiglobulina de ratón marcada con isotiocianato de fluoresceína.**

**Azul de Evans.**

**Glicerol.**

**3. Equipo.**

**Balanza analítica.**

**Pipetas automáticas de 50 ul, 100 ul, 200 ul.**

**Reloj cuenta células.**

**Microscopio.**

**Equipo de disección.**

**Cryo-Cut. (MICROM HM 505 N, Serie No. 9030)**

**Microscopio para inmunofluorescencia.**

**Congelador marca Sanyo, (Serie No. 31002282) de 6 a - 80 °C.**

**D. METODOLOGIA**

**1. Inoculación**

Las cepas de estudio se inocularon a ratones albinos de 6 a 7 semanas y con un peso entre 25 a 30 gramos. Se sabía que estas cepas tenían una máxima parasitemia a los 21 días, fue este el día ideal para poder inocular a los 130 ratones.

**2. Determinación de la parasitemia**

Para obtener suficientes tripomastigotes sanguíneos la cepa a estudio se inoculó primero a ratones albinos recién nacidos y luego fueron pasados a ratones de 4 semanas de edad.

**3. Curvas**

Las curvas de parasitemia fueron establecidas inoculando por via intraperitoneal  $2 \times 10^5$  tripomastigotes sanguíneos por animal en grupos de 4-8 ratones de 4 semanas de edad. Los ratones infectados se observaron en días alternos, sangrándolos de la cola y contando el número de tripomastigotes en 5 microlitros de sangre (91).

**4. Sacrificio**

Se sacrificaron ratones a los 7, 14, 21, 28 y 32 días de la parasitemia para la obtención

de los órganos (cerebro, bazo, corazón, hígado, músculo esquelético).

### **5. Cortes histológicos**

Los tejidos de preferencia se trabajaron de inmediato, en caso contrario se congelaron a temperaturas de -40 a -70 °C.

Cuando los tejidos se trabajaron de inmediato se fijaron con formol al 40 por ciento peso/volumen (p/v), mientras que los tejidos congelados se descongelaron y luego fueron fijados con formol.

#### **a. Técnica de los cortes en criostato**

- I. Se eligió un bloque adecuado de tejido fresco, que se regularizó con una hoja de bisturí nueva hasta que sus caras fueron paralelas. De preferencia el bloque debe tener de 2 a 4mm de espesor cuando menos, por el peligro de que el disco mecánico portaobjetos toque el borde de la cuchilla, sin embargo, se pueden elevar los bloques más delgados empleando una capa más gruesa de compuesto O. C. T. (medio de embebido para tejidos congelados).**
- II. Cuando el tejido fue congelado satisfactoriamente, se insertó el disco portaobjetos en la pinza del micrótomo, disponiendo la inclinación y el ángulo de manera que la superficie del bloque (y la del disco portaobjeto) se encontraran en el plano de corte y el borde del bloque fuera paralelo al de la cuchilla. Se aseguró de que el sistema de avance del micrótomo se encontrara en la posición de arranque.**
- III. Se liberó la pinza de la cuchilla y se desplazó en conjunto hasta que el borde de la cuchilla tocó al bloque.**
- IV. Se verificó que todas las pinzas estuvieran apretadas (manualmente). Se empleó un avance rápido manual para regularizar el bloque hasta que se obtuvo el corte completo que se deseaba.**
- V. Luego se puso en posición requerida para los controles del grosor del corte y el**

mecanismo de avance automático, se verificó la limpieza de las superficies de la cuchilla y el borde de la superficie inferior de la placa contra enrollamiento.

- vi. La placa contra enrollamiento se colocó de manera que su borde fuera paralelo al borde la cuchilla y al mismo nivel (en ciertos aparatos, es conveniente colocar en ésta placa una fracción de milímetros por delante del borde de la cuchilla).
- vii. Una vez que fueron preparados los cortes, se abrió el gabinete y se manejó hacia atrás la placa contra enrollamiento. Se hizo bajar cuidadosamente sobre el corte un portaobjetos limpio.
- viii. En el caso de los cortes de tejido fresco sin fijar, no se necesita adherente, sólo agitar el corte algunos segundos en el aire, o de preferencia fijarlo inmediatamente en en formol-alcohol (15 ml de formol al 40 por 100 y 85 ml de alcohol etílico al 95 por 100, si se desea puede añadirse 5 ml de Acido acético glacial). Sin embargo, los cortes de tejido fijados en formol u otra solución no se adhieren al vidrio (78, 79).

## **6. Inmunofluorescencia**

- a. Se descongelaron las láminas necesarias con antígeno (Ag) es decir de los órganos congelados y fueron secadas a temperatura ambiente.
- b. Se agregó 50 ul del suero de ratón en las láminas.
- c. Se incubó a 37 °C durante 30 minutos en cámara húmeda.
- d. Se lavaron las preparaciones sumergiendo en PBS durante 5 minutos con agitaciones ocasionales y luego 5 minutos en agua destilada.
- e. Se secaron las preparaciones con papel filtro.
- f. Se diluyó el conjugado antiglobulina de ratón (IgG) a la dilución de trabajo (1:20) con Azul de Evans.
- g. Se repitieron los pasos c, d, e.
- h. Se montaron las preparaciones con glicerol al 90 por ciento en PBS.



- i. **Fué observada la fluorescencia verde de los amastigotes con el objetivo de 10 para tamizaje y con el objetivo de 40 para confirmar, mediante un filtro excitado BS-12 y barrera K-530.**
- j. **Se evaluó la presencia o ausencia del parásito en los tejidos, de la siguiente forma (92-94) :**

+     0 - 9  
++    10 - 19  
+++   20 - más

#### **7. Diseño de Investigación:**

##### **Muestra:**

**Se utilizaron 130 ratones albinos con peso de 25 a 30 gramos y con edad de 5 a 7 semanas, de los cuales 65 fueron inoculados con *T. cruzi* cuya parasitemia fue baja y 65 con parasitemia alta, estas dos cepas fueron extraídas de ampolla rectal de *Triatoma dimidiata*. Las chinches se recolectaron en Villa Canales por Rodas en 1992 (95). Y los cinco órganos (cerebro, hígado, bazo, corazón y tejido esquelético) fueron utilizados para la evaluación del tropismo tisular por medio de inmunofluorescencia.**

**El tamaño de la muestra se determinó tomando en cuenta estudios de otros países sobre la incidencia de *T. cruzi* en los distintos órganos, usándose 65 ratones (13 por cada tiempo siendo éstos a los 7, 14, 21, 28 y 32 días), se asumió una varianza esperada de 0.16 de acuerdo a si había o no respuesta de la parasitemia y su relación con los diferentes órganos, un límite de error (LE) de 10 por ciento y un nivel de confianza de 95 por ciento.**

#### **8. Análisis de Resultados:**

**Se utilizaron pruebas no paramétricas para analizar la respuesta cuantitativa, para demostrar si la cantidad de parásitos era igual en cada tiempo y organos (Friedman).**

**La respuesta cualitativa binomial se usó para saber si el tiempo en cada organo era igual, segun el número de positivos (Chi-cuadrado).**

## VIII. RESULTADOS

En la tabla No. 1 se observa el tropismo en las distintas semanas, en donde se puede ver que el cerebro presenta un tropismo que aumenta en la 1ra semana, disminuye y se mantiene en la 2da y 3ra semana y aumenta en la 5ta semana de infección, siendo la 4ta semana el punto mas bajo de infección (ambas cepas).

El corazón presenta un tropismo más constante en casi todas las semanas, disminuyendo mas en la 2da semana (ambas cepas).

El músculo esquelético, al igual que el corazón presenta un tropismo constante; disminuyendo su tropismo en la 4ta semana de infección, para la Cepa I, mientras que la Cepa II presenta un leve aumento en el tropismo en la 5ta. semana de infección.

El hígado presenta un tropismo aumentado en la 1ra semana, el cual va disminuyendo hasta la 3ra. semana, mientras que en la 4ta. semana vuelve a aumentar y disminuye en la 5ta. semana (ambas cepas) (Graficas 1-10).

El tropismo del bazo no es muy aumentado como el del hígado y cerebro, en las primeras semanas y va disminuyendo más en la 2da., 3ra. y 4ta. semana, teniendo al final de la 5ta. semana un tropismo muy escaso (ambas cepas).

En la tabla No. 2 se observa la cantidad de parásitos observados en los tejidos por semana, en donde el cerebro presentó la mayor cantidad de parásitos entre la 1ra., 2da. y 3ra. semana (20 ó más por tejido), no así la 4ta. y 5ta. semana (1-9 por tejido).

El corazón presenta una menor cantidad, en la 1ra semana (1-9 parásitos por tejido), y una cantidad constante de parásitos en la 2da, 3ra y 4ta semana (10-19 por tejido), y es en la 5ta semana en la que se presenta mayor cantidad de parásitos por tejido (20 ó más por tejido). Además es en ésta semana donde se empezó a observar amastigotes, en 3 de los 12 tejidos analizados.

El hígado, al igual que el cerebro presentó en la 1ra semana la mayor cantidad de

**parásitos (20 ó más por tejido) mientras que en las siguientes 3 semanas, la cantidad de parásitos fue menor (10-19 por tejido). Siendo la 5ta semana, en la que fue menor la cantidad de parásitos que se obtuvo (1-9 por tejido).**

**El bazo presentó cantidades constantes de parásitos ya que la 1ra, 2da, y 3ra semana, fue la misma (10-19 por tejido) y la 4ta y 5ta semana se observó la menor cantidad de parásitos (1-9 por tejido).**

## IX. DISCUSION DE RESULTADOS

La enfermedad de Chagas tiene un gran variabilidad en cuanto a sus manifestaciones clínicas, las cuales van desde cardiopatía severa y/o dilatación del tracto digestivo hasta individuos aparentemente asintomáticos (7, 29, 32, 36).

En relación al parásito, las cepas han sido caracterizadas de acuerdo a su morfología, inducción de parasitemia, velocidad de multiplicación, patogenicidad y tropismo tisular, habiéndose encontrado diferencias entre las clonas, las que se cree que están íntimamente relacionadas con su ciclo tan complejo y la presencia de tres estadios tan diferentes (47, 51, 52, 57-60).

Respecto a la caracterización de las cepas guatemaltecas es muy poco lo que se ha estudiado, iniciándose cuando Monroy (96) quien en 1986 aisló cuatro cepas de *T. cruzi* de pacientes con cardiomegalia, utilizando para ello el métodos de xenodiagnóstico. En cuatro cepas mostraron una parasitemia baja pero persistente, alcanzando los niveles máximos a los 20 días de la infección, bajando considerablemente después de los 45 días.

En 1992 Rodas (95), caracterizó biológicamente cinco cepas de *T. cruzi* aisladas de *T. dimidiata* y *T. nttida*, las cuales poseen la propiedad de infectar, reproducirse y causar sintomatología en el modelo animal, en donde las curvas de parasitemias fueron diferentes entre las cinco cepas.

En la actualidad Matta (97), ha realizado caracterizaciones de cepas guatemaltecas, obteniendo curvas que tienen gran variabilidad en la respuesta, desde parasitemias escasas de un sólo pico y luego desaparecen hasta parasitemias fluctuantes.

Otros estudios demuestran que el comportamiento de las cepas, al compararse entre sí, son bastantes similares y que el pico máximo de crecimiento se obtiene entre el día 10 y 15 después de su inoculación (98).

Todos los estudios muestran variabilidad intra-especie y se hace necesario determinar su

relación con la presentación clínica de la enfermedad y respuesta al tratamiento.

En nuestro país se desconoce el comportamiento de cepas nativas en lo que respecta al tropismo tisular. A nivel americano se han realizado estudios de tropismo tisular en donde Andrade y Andrade (55), encontró lesiones histopatológicas reticulares, usando cepa Y, y miocárdicas usando cepas Colombianas. Gollard (57), observó tropismo tisular del miocardio en cepas mexicanas. Campos (59), describió neurotropismo de nervios gangliolares en cepa Y pero no en cepas Colombianas.

En Centroamérica, Zaldaña (53), en Panamá, realizó estudios de cinco cepas nativas, encontrando tropismo en músculo esquelético y corazón y bajo tropismo en cerebro en la etapa temprana, observando amastigotes, en esta misma etapa (53).

En este estudio se evaluó el tropismo tisular de dos cepas de *T. cruzi* cuyas curvas de parasitemias fueran distintas (MAR-5 y MAR-6). Se estudió el tropismo en ratones como modelo experimental en un tiempo de 5 semanas. Se evaluó simultáneamente la parasitemia microscópica por medio del método de Filardi (9) para cada semana.

Los resultados se analizaron en dos partes, siendo la primera el análisis de la respuesta cuantitativa, con el objeto de demostrar si la cantidad de parásitos es igual en cualquier tiempo en cada órgano, los resultados indican que sí hay diferencia significativa ( $p < 0.05$ ).

En la 4ta. semana, el hígado y corazón presentaron mayor cantidad de parásitos y en segundo lugar el músculo esquelético, mientras que la invasión por cerebro disminuyó drásticamente, (usándose la prueba de Friedman).

El corazón y el músculo esquelético, presentaron la mayor cantidad de parásitos, para ambas cepas, con respecto a los demás órganos al final de la evaluación (5ta semana). Lo cual indica que en la 1ra. semana hay una mayor penetración en el hígado y cerebro, perdiéndose en el cerebro y aumentándose la penetración en músculo esquelético y corazón en la 4ta. semana.

La 5ta. semana es para el parásito la etapa de proliferación, ya que es en ésta semana donde se observaron los amastigotes en el corazón.

Al comparar éstos resultados con los de Zaldaña (53) se puede observar que difieren un poco, ya que el corazón y músculo esquelético presentaron un tropismo bajo en la fase temprana, y los amastigotes sí fueron observados, pero en la fase terminal (5ta semana), mientras que el cerebro, no presentó amastigotes en la fase temprana, pero sí la mayor cantidad de parásitos.

Según la clasificación de Andrade (47) ambas cepas estarían dentro del TIPO III, ya que tienen picos altos entre el 20 a 30 día de la infección y presentan un tropismo miocárdico y de músculo esquelético, cuyo prototipo es la Cepa Colombiana.

Según Schlempler y col. (56) éstas cepas estarían clasificadas, según su parasitemia, en cepas de virulencia intermedia, para la cepa II (pico máximo  $7 \times 10^5$ ), y de alta virulencia, cepa I (pico máximo  $7 \times 10^7$ ), aunque la cepa I no presentó morbilidad alguna.

También se analizó si la cantidad de parásitos es igual entre órganos para cada tiempo (Friedman,  $p < 0.01$ ), se observó que sólo el hígado presenta una diferencia significativa en la 1ra y 5ta semana para la cepa I (MAR-6), mientras que la cepa II (MAR-5), presenta una diferencia significativa en cerebro y en hígado, donde el cerebro presentó diferencia en la 1ra. y 4ta. semana y el hígado en la 1ra. y 5ta. semana.

Esto indica que la cepa II, cuyo pico máximo es de  $7 \times 10^5$  tripomastigotes/ml en la 4ta. semana, no afecta el tropismo de la misma sobre los órganos, mientras que la cepa I, cuyo pico máximo es de  $7 \times 10^7$  tripomastigotes/ml en la 3ra semana no afecta tampoco el tropismo en el cerebro e hígado. Independientemente de la parasitemia alta o baja, se mantiene el nivel de penetración celular en los órganos (corazón hígado y músculo esquelético).0

Los resultados también fueron analizados por la respuesta cualitativa binomial (+ o -) entre el tiempo y en cada órgano, se usó la prueba de Chi-cuadrado indicando que no existe diferencia significativa en ambas cepas y entre semanas según el número de positivos, en todos

los órganos estudiados ( $p > 0.05$ ).

Para saber si hay diferencia entre órganos en cada tiempo, se uso la prueba de Cochran, la cual indica que no existe ninguna diferencia significativa en ambas cepas ( $p > 0.05$ ) en todas las semanas. Además ésta prueba se utilizó para saber si la cantidad de positivos, en las distintas cepas, tiene o no significancia, sin importar el órgano, indicando que si hay diferencia significativa entre cepas, ésta diferencia se pierde al eliminar órganos como el bazo y el cerebro. Por lo que en órganos como el corazón, hígado y músculo esquelético, la diferencia se mantiene para MAR-6 con parasitemia alta. Se puede concluir que ésta cepa tiene mayor capacidad de invasión la cual se diluye a otros órganos como el bazo.

La prueba de Cochran indica que ambas cepas se comportan de igual manera sin importar el pico máximo de parasitemia entre órganos, pero sí hay diferencia significativa entre cepas y órganos con respecto a la proporción de positivos y negativo, ( $p < 0.05$ ), ya que el tiempo no interfiere.



## X. CONCLUSIONES

1. Los resultados encontrados demuestran que no hay asociación entre los picos altos y bajos de parasitemia con el tropismo del parásito en los órganos.
2. El comportamiento de las cepas guatemaltecas utilizadas en éste estudio tienen una secuencia de invasión de tejidos similar, independientemente de que una sea de parasitemia alta y otra de parasitemia baja.
3. Ambas cepas tienen el mismo ciclo de preferencia de invasión.
4. No hay diferencia en la invasión con respecto al tiempo en ambas cepas.
5. Las cepas (MAR-5 y MAR-6), invaden en las primeras semanas el cerebro e hígado, para luego invadir el músculo esquelético y corazón, mientras que en la fase terminal proliferan en el corazón.
6. Los órganos blanco más afectados en el modelo animal utilizado fueron el músculo esquelético, corazón e hígado.
7. Las cepas se diferencian en la elección de órganos, la cepa de alta parasitemia, MAR-6, muestra invasión a bazo, mientras que la cepa II, MAR-5 no lo invade.
8. La secuencia de invasión (positividad) es el músculo esquelético, hígado, corazón, cerebro y bazo para ambas cepas.

## **XI. RECOMENDACIONES**

- 1. Continuar con el estudio de cepas nativa de *T. cruzi* sobre el tropismo tisular y evaluar aquellas que ya han sido caracterizadas biológica y bioquímicamente.**
- 2. Evaluar cepas que han presentado alto grado de virulencia.**
- 3. Recomendar evaluación neurológica en sintomatología clínica aguda, ya que las cepas invaden el cerebro .**
- 4. Efectuar estudios de tropismo tisular de cepas aisladas de otro vector, para comparar comportamiento entre vectores.**

## XII. REFERENCIAS

1. Pereira M. Epidemiología. (In Brener, Z. y Andrade Z.) *T. cruzi* e Doença de Chagas. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 1979;74-80:450p.
2. Castillo A. Seroepidemiología de la Enfermedad de Chagas en el suroriente de Guatemala. Guatemala: Universidad de San Carlos. (Tesis de Graduación, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia) 1987, 57p.
3. Sherlock FA. Vectores. (In Brener Z. y Andrade Z.) *T. cruzi* e Doença de Chagas. Rio de Janeiro: Guanabara Koogans. 1979;68-70:450p.
4. Chagas C. Editorial. Bol OPS. 1959;46(6):566-569.
5. Beck JW, David JE. Parasitología Médica. 3ed. Elinzondo, R. trad. Mexico: Interamericana, 1984 VIII+340 (p. 63-68).
6. Pesspa BS. Parasitología Médica. 6ta ed. Rio de Janeiro Brasil: Guanabara Koogan S.A. 1963, 610p.
7. Perez A. Estudio sobre la inmunidad al Agente de la Enfermedad de Chagas en Comunidad Escondida de Guatemala: Universidad De San Carlos. (Tesis de Graduación, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia). 1980, 57p.
8. Koberle F. Chagas's disease and Chagas's syndroms: The pathology of American Trypanosomiasis. Adv Parasitol. 1968;6:63-116.
9. Filardy LS, Brener Z. A Rapid method for testing *in vivo* of Different strain of *T. cruzi*, Rio de Janeiro: Mem Inst Oswaldo Cruz. 1984;79(2):221-25
10. Agencia de Cooperación Internacional del Japon (JICA). Enfermedades Tropicales en Guatemala 93. Informe Anual. 1993,(2)150.
11. Peñalver ML, *et al.* Aportes al conocimiento de la Enfermedad de Chagas en Guatemala. Rev Coleg Med. 1953;4(1):20-22.

12. Cáceres A, *et al.* Proyecto para el apoyo inicial de un programa de investigación sobre epidemiología y prevención de la Enfermedad de Chagas en Guatemala. Universidad de San Carlos de Guatemala. Escuela de Química Biológica, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. 1980: Doc. Tec. 12p.
13. Hernández J. Consideraciones sobre la obra científica del Autor José Romeo de León. Piedrasanta, Guatemala: Universidad de San Carlos. (Tesis de Graduación, Facultad de Ciencias Médicas). 1977, 75p.
14. Ministerio de Bienestar Social de Salud Pública. Actualización sobre la Enfermedad de Chagas. Argentina: Dirección Nacional de Promoción. Depto. de Zoonosis y Reservorio. 1972, 15p.
15. Peñalver ML. Estado de la Enfermedad de Chagas en Guatemala. Rev Coleg Med. 1953;4(4):294-306.
16. Labbe CF. Investigación Serológica y Electroforéticos en la Enfermedad de Chagas. Guatemala: Universidad de San Carlos, (Tesis de Graduación. Facultad de Ciencias Médicas). 1963, 28p.
17. Arriaza C. Enfermedad de Chagas en niños escolares (Estudio Prospectivo de respuesta inmunológica a *T. cruzi* utilizando el método de H.A.I. en 100 niños de 7 a 15 años en los municipios de Olopa (Chiquimula) y Oratorio (Santa Rosa), Guatemala: Universidad de San Carlos. (Tesis de Graduación, Facultad de Ciencias Médicas). 1983, 28p.
18. Martínez Y. Determinación de anticuerpos chagásicos (Estudio prospectivo realizado en 100 pacientes de Consulta Externa del Hospital Nacional de Cuilapa). Guatemala: Universidad de San Carlos. (Tesis de Graduación, Facultad de Ciencias Médicas). 1984, 25p.

19. Sandoval GF. **Determinación de Anticuerpos para la Enfermedad de Chagas en Donadores de Sangre (Estudio Prospectivo en 100 donadores de Sangre del Hospital Nacional de Escuintla).** Guatemala: Universidad de San Carlos. (Tesis de Graduación, Facultad de Ciencias Médicas). 1984, 25p.
20. Mecke GA. **La epidemiología de la Enfermedad de Chagas en relación con el ecosistema de Omicilaris.** Interciencia. 1983;8:353-66.
21. Monroy C. **Vectores de la Enfermedad de Chagas en Guatemala.** Guatemala: Memorias del I Seminario Internacional de Enfermedades Tropicales. JICA, 1992, 128p.
22. Zeledón R. **Los vectores de la Enfermedad de Chagas.** Buenos Aires: Sociedad Argentina de Parasitología. 1972. (p. 327-45).
23. Lont HW. **Revision of the Triatominae (Hemiptera, Reduviidae) and their significance as vector of Chagas' disease.** Bull Am Mus Nat Hist. 1970;163:125-520.
24. **Boletín Oficina Sanitaria Panamericana. Situación de la Enfermedad de Chagas en las Américas.** 1984;97(2):159-164.
25. Cheng CT. **General Parasitology.** New York, E.E.U.U.: Academia Pres, 1973. 590p.
26. Fernández M. **Electrocardiograma del Trypanosómico.** Guatemala. Rev Coleg Med, 1958;8:2-6.
27. Fernández J. **Primer caso de Cardiopatía Chagásica con comprobación Necrótica estudiado en Guatemala, en un enfermo atendido en el Hospital General San Juan de Dios.** Escuela de Medicina. 1952;4:4-10.
28. PAHO. **Status of Chagas's Disease in the Region of Americans.** Bull PAHO. 1984;5:5-9.
29. **Organización Panamericana de la Salud. Enfermedad de Chagas.** Bol Epidemiol, 1982;3(3):1-5.
30. PAHO. **American Trypanosomiasis Research Symposium International, Brasil: Public No. 318, 1975. 15p.**

31. Brener Z, Andrade Z. *T. cruzi* e Doença de Chagas, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 1979. 680p.
32. Rowen A, *et al.* Inmunología de la Enfermedad de Chagas. Bol OMS. 1974;50:459-492.
33. Mercado TI. Lisis of *T. cruzi* by *Pseudomonas fluorescens*. Antimicrob Agent Chemoter. 1982;22:6.
34. Organización Panamericana de la Salud. Aspectos Clínicos de la Enfermedad de Chagas. Bol OPS. 1974;77(2):141-155.
35. Organización Panamericana de la Salud. Enfermedad de Chagas. Bol Epidemiolog. 1982;2(2):14-19.
36. World Health Organization. Immunology of Chagas's disease. Memoranda, 1974;50:449.
37. Organización Mundial de la Salud. Situación de la Enfermedad de Chagas en las Américas. Bol Epidem OPS. 1984;5:5-4.
38. Brown H. Parasitología. 4ta ed. México: Interamericana, 1974;(344-55).
39. Beeson P, Mcdermott B. Tratado de Medicina Interna de Cecil Loeb, 9a ed., México: Interamericana. 1977. (p. 567-572).
40. Rodas M. Cambios Electrocardiográficos en la Miocarditis Chagásica. Guatemala: Universidad de San Carlos. (Tesis de Graduación, Facultad de Ciencias Médicas). 1977, 53p.
41. Pinto JC. Cardiopatía chagásica: Mito y desafío. Arch Inst Cardiol Mex. 1990;60:119-120.
42. American Heart Journal. Cardiomiopatía crónica de Chagas. ILADIBA 1991;8:36-37.
43. Macedo V. Estudios evolutivos de Formas Indeterminadas da Doença de Chagas, Resumo de XIII Congresso Nacional Brasileiro de Medicina Tropical Belen. 1978, 295p.
44. Bosensin E. Cuadro Clínico, Diagnóstico. Rev Dialogo Médico. Doença de Chagas. 1980;5:4.

45. Peñalver L, Fajardo J y Vizcano C. El problema de la Cardiopatía Chagásica en Guatemala. Rev Coleg Médico, Guatemala. 1954;5:181-193.
46. Organización Mundial de la Salud. Aspectos Clínicos de la Enfermedad de Chagas. Bol of Sanit Panam. 1974;77:141-155.
47. Andrade SG. Morphological and Behavioural Characterization of *T. cruzi* strains. Rev da Soc Bras de Med Trop. 1985;18(suplemento);39-36.
48. Andrade SG. Correlation between isoenzyme patterns and biological behavioural of different strains of *T. cruzi*. Trans of the Roy Soc of Trop Med Hyg. 1983;77:796-799.
49. Morel C, *et al.* Strains and clones of *T. cruzi* can be characterized by pattern of restriction endonuclease minicircles. Prod Matl Acad Sci USA. 1980; 77 (11): 6810-6814.
50. Andrade V. Estudio inmunopatológico de Camundongos de sus diferentes linhagens Isogénicos a Infecção por tres tipos de cepas do *T. cruzi*, Thesis, Salvador Bahía, Brasil. 1984. 45p.
51. Juracy B, *et al.* Comportamiento das cepas Y e Peruana do *T. cruzi* no camundongo, apos passagen em diferentes Melos. Mem Inst Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro. 1985;80(1):41-50.
52. Mazzotti L. Variaciones in Virulence for Mice and Guinea-pigs in Strains of *T. cruzi* Chagas from Different Species of Bugs (triatomidae) from Diferents Localities in México. Amer J Hyg. 1940;31:67-85.
53. Zaldfia PA. Inmunoparasitological studies of *T. cruzi* clones from Panama. Stockholm, Sweden: The Karolinska. International Reseach Training Program (KIRT). (Tesis de Maestría) 1990. 64p.
54. Carrasco JA. Biological and Immunological characterization of *T. cruzi* strains from Honduras. Stockholm Sweden: The Karolinska International Research Training Program (KIRT). (Tesis de Maestría). 1990, 60p.

55. Andrade SG. Tentative for grouping different *T. cruzi* strains in some type. Rev Insti Med Trop Sao Paulo. 1976;18:140-141.
56. Schlemper Jr BR, *et al.* Course of infection and histopathological lesions in mice infected with seventeen *T. cruzi* strains isolated from chronic patient. Rev Soc Bras Med Trop. 1993;6:23-26.
57. Andrade SC. Caracterização de cepas de *T. cruzi* isoladas no reoncavo Baiano. Rev Pat Trop. 1974;3:65-121.
58. Melo RC, Brener Z. Tissue tropism of different *T. cruzi* strains. J Parasitol. 1978;64:475-482.
59. Hudson L. Immunopathogenesis of experimental Chagas's disease in mice: damage to the autonomic nervous system. Cytopathology of Parasitic disease. 1973; Ciba Foundation symposium 99:234-251.
60. Nussenzweig V. *et al.* Differences in antigens constitution of strains of *T. cruzi*. Exp Parasitol. 1963;14:221-227.
61. Dvorak JA, *et al.* *T. cruzi*: Elemental composition heterogeneity of cloned stock. Mole and Bioch Parasitol. 1988;31:19-26.
62. Segura EL, Cazulo JJ. Antigenic Characterization of *T. cruzi*. Rev da Soc Bras de Med Trop. 1985;18(suplemento):47-51.
63. Brener Z. Comparative studies of different strains of *T. cruzi*. Ann Trop Med Paras. 1965;59:19-26.
64. Brener Z. The behavior of slender and broad forms of *T. cruzi* in the blood stream of normal and immune mice. Ann Trop Med Parasitol. 1969;63:215-220.
65. Brener Z. General review on *T. cruzi* classification and taxonomy. Rev Soc Bras Med Trop. 1985;18:1-8.
66. Lynch M, *et al.* Métodos de Laboratorio. 2da ed. México: Editorial IAM. 1972. 1522p.



67. Kargan G, *et al.* Evaluación de Pruebas Serológicas utilizadas para Estudios de la Enfermedad de Chagas. *Bol of Sanit Panam.* 1979;87(4):309-317.
68. Guerreiro C, Machado A. Da reacao de Brodet e Gengou na molestia de Carlos Chagas como Elemento diagnóstico. *Brazil Med.* 1913;27:225-226.
69. Kessel JF, *et al.* An Complement Fixation Test for Chagas' disease employing an Artificial Culture Antigen. *Amer J Trop Med.* 1936;16:405-415.
70. Senekjie H. Immunologic Studies in Experimental *T. cruzi* Infections: 2 Slice Agglutination and Intradermal Test. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1943;52:56-59.
71. Siqueira AF, *et al.* Aspectos inmunitarios iniciales observados em raton infectados por *T. cruzi*. I Reacoes de tripomastigotas recuperados emm dias sucessions da infeccao. *Rev Bras Pesq Med Biol.* 1978;1;35-37.
72. Mazza M, Pifano F. O Diagnóstico da Molestias de Chagas por Intradermoreaccão comm Cultura de *Schizotrypanum cruzi* *Brazil Med.* 1941;55:317-319.
73. Sadun H, *et al.* Fluorescent antibody test for the Serodiagnosis of African and American Trypanosomiasis in man. *J Parasitol.* 1963;49:385-388.
74. Carneiro O, *et al.* Investigacao sorológica para doenca de Chagas pela reacao de imunofluorescencia en Indios de Goias e Mato Grosso, Brasil. *Rev Goiana Med.* 1977;314:119-123.
75. Caillez M, *et al.* Valeur comparee de Immuno fluorescence et de Immunologique des trypanosomes africaines. *Bul Soc Path Exot.* 1977;70:391-398.
76. Toussaint AF, *et al.* An Indirect Fluorescent antibody Technique Using Soluble Antigen for Serodiagnostic of *T. cruzi* Infections. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1965;120:783-785.
77. Zimeri F. Detección de infección congénita por *T. cruzi* en recién Nacidos de bajo peso al Nacer. Guatemala: Universidad de San Carlos. (Tesis de Graduación, Facultad de Ciencias Médicas). 1988, 41p.

78. Sheerhan H. Theory and Practice of Histotechnology. 2da ed. Mosby ed. 1992. 481p (p. 15-18).
79. Cullines CF, Allizon W. Cellular Pathology Technique. 4ta ed. Butterworths. New York:1991. 642p (p. 46, 104-109, 616-618).
80. Docampo R, Moreno S. Biochemycal toxicology of antiparasitic compuounds in the chemoterpy an chemoprophylazis of American Trypanosomiasis (Chagas's Disease). Rev Bioch Tox. 1985;7:159-203.
81. Filardi Ls, Brener Z. A nitroimidazole-thiadiazole derivate with curative action in experimental *T. cruzi* infections. Ann Of Trop Med Parasitol. 1992;76(3):293-297.
82. Goodman L, Gilman A. Drogas usadas en las infecciones protozoaricas. En sus bases, Farmacológicas de la Terapeútica. 6ta Ed. Buenos Aires: Médica Panamericana. 1982, 1756p.
83. Morollo A. The blochemistry of the action of drugs an the detoxication mechanisms in *T. cruzi*. Comp Blochem Physiol. 1988;90(1):1-12.
84. Brener Z. Present Status, Chemotherapy and Chemoprophylaxis of human Trypanosomiasis In the Estern Hemisphere. Pharmacol Ther. 1979;7:71-90.
85. Abitbal H. Treatment of Chagas disease. An R Acad Nac Med (Madrid). 1981;91(4):755-758.
86. Docampo R, Moreno S. Mechanism of Nufurtimox toxyty in diferente forms of *T. cruzi*. Blochem Pharmacol. 1981;30:1947-1951.
87. Barlet PA, *et al.* The efficacy off movel compound (a) 1-(4-bromo -4-biphamyl) -1-(4-diphenyl)-3-dimethyl amino propene against *T. cruzi* in mice. Experientia. 1982;38(3):3389.

88. **Andrade SG, et al. Therapeutic action of MK-436 (nitromidazole) on *T. cruzi* in infections in mice: a parasitological serological, histopathological, and ultrastructure study. Bol WHO. 1987;65(5):625-623.**
89. **WHO. Publicación científica No. 811 Control Of Chagas Disease, Geneva 1991. 95p (p. 12).**
90. **Rodas A. Caracterización Biológica de cinco Cepas guatemaltecas de *T. cruzi* aisladas de *T. dimidiata* y *T. nitida*, Guatemala: Universidad de San Carlos. (tesis de graduación, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia) 1994. 44p.**
91. **Carrasco J, et al. Caracterización Parasitológica de STOCKS de *T. cruzi* aisladas en Honduras. Departamento de Microbiología. Universidad Nacional Autónoma de Honduras y Laboratorio Central, Ministerio de Salud Pública. Guatemala Memorias del VIII Congreso Latinoamericano de Parasitología y I Congreso Guatemalteco de Parasitología y Medicina Tropical. 364p. 1987.**
92. **Goldan M. Fluorescent Antibody Methods, New York: Academic Pres. 1968. 578p.**
93. **Ourth D. An Immunofluorescent test for *T. gondii* in Tissues. Immunol. 1971;20:437-439.**
94. **Universidad de Costa Rica. Serie Ciencia Médica No. 26. Curso Internacional de Técnicas de Diagnóstico con Anticuerpos Fluorescentes. Tomo I y II. 1964. 1522p.**
95. **Agencia de Cooperación Internacional del Japon (JICA). Enfermedades Tropicales en Guatemala 94. Informe Anual. 1994(2). 207p (p. 110)**
96. **Monroy M. Aislamiento y Caracterización de cuatro Cepa de *T. cruzi* del oriente de Guatemala, Mem VII congreso Latinoamericano de Parsitologia y Medicina Tropical. Guatemala, 1987. 266p (p. 36).**
97. **Matta V, et al. Caracterización de la Cepas guatemaltecas de *T. cruzi* en base a su curza de crecimiento *in vivo*. Mem II Conferencia del "Proyecto para la Investigación de Enfermedades Tropicales", JICA. Guatemala, 1995. 43p.**

98. Cruz D, *et al.* Caracterización de Cepas guatemaltecas de *T. cruzi* por Curvas de Crecimiento *in vitro*. Mem II Conferencia del "Proyecto para la Investigación de Enfermedades Tropicales", JICA. Guatemala, 1995. 43p.

# ANEXOS

**T A B L A No. 1**  
**CANTIDAD DE CORTES INFECTADOS POR**  
*T. cruzi*

<b>ORGANO</b>	<b>CEREBRO</b>		<b>CORAZON</b>		<b>MUSC. ESQ.</b>		<b>HIGADO</b>		<b>BAZO</b>	
<b>TOTAL</b>	<b>12</b>		<b>12</b>		<b>12</b>		<b>12</b>		<b>12</b>	
	<b>CI</b>	<b>CII</b>	<b>CI</b>	<b>CII</b>	<b>CI</b>	<b>CII</b>	<b>CI</b>	<b>CII</b>	<b>CI</b>	<b>CII</b>
<b>1ra. Semana</b>	<b>8</b>	<b>9</b>	<b>7</b>	<b>7</b>	<b>9</b>	<b>9</b>	<b>9</b>	<b>9</b>	<b>6</b>	<b>6</b>
<b>2da. Semana</b>	<b>4</b>	<b>4</b>	<b>6</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>7</b>	<b>7</b>	<b>7</b>	<b>7</b>	<b>6</b>
<b>3ra. Semana</b>	<b>4</b>	<b>4</b>	<b>8</b>	<b>8</b>	<b>8</b>	<b>8</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>5</b>	<b>5</b>
<b>4ta. Semana</b>	<b>3</b>	<b>3</b>	<b>7</b>	<b>7</b>	<b>6</b>	<b>6</b>	<b>9</b>	<b>9</b>	<b>5</b>	<b>7</b>
<b>5ta. Semana</b>	<b>5</b>	<b>4</b>	<b>7</b>	<b>7</b>	<b>6</b>	<b>8</b>	<b>6</b>	<b>5</b>	<b>3</b>	<b>3</b>

**CI = Cepa I (Mar-06)**

**CII = Cepa II (Mar-05)**

**T A B L A No. 2**  
**CANTIDAD DE PARASITOS OBSERVADOS EN LOS TEJIDOS INFECTADOS POR**  
*T. cruzi*

ORGANOS	CEREBRO	CORAZON	MUSC. ESQ.	HIGADO	BAZO
	CI y CII	CI y CII	CI y CII	CI y CII	CI y CII
	P. x T.	P. x T.	P. x T.	P. x T.	P. x T.
1ra. Semana	20 ó mas	1 - 9	1 - 9	20 ó mas	10 - 19
2da. Semana	20 ó mas	10 - 19	10 - 19	10 - 19	10 - 19
3ra. Semana	20 ó mas	10 - 19	10 - 19	10 - 19	10 - 19
4ta. Semana	1 - 9	10 - 19	10 - 19	10 - 19	1 - 9
5ta. Semana	1 - 9	20 ó mas **	10 - 19	1 - 9	1-9

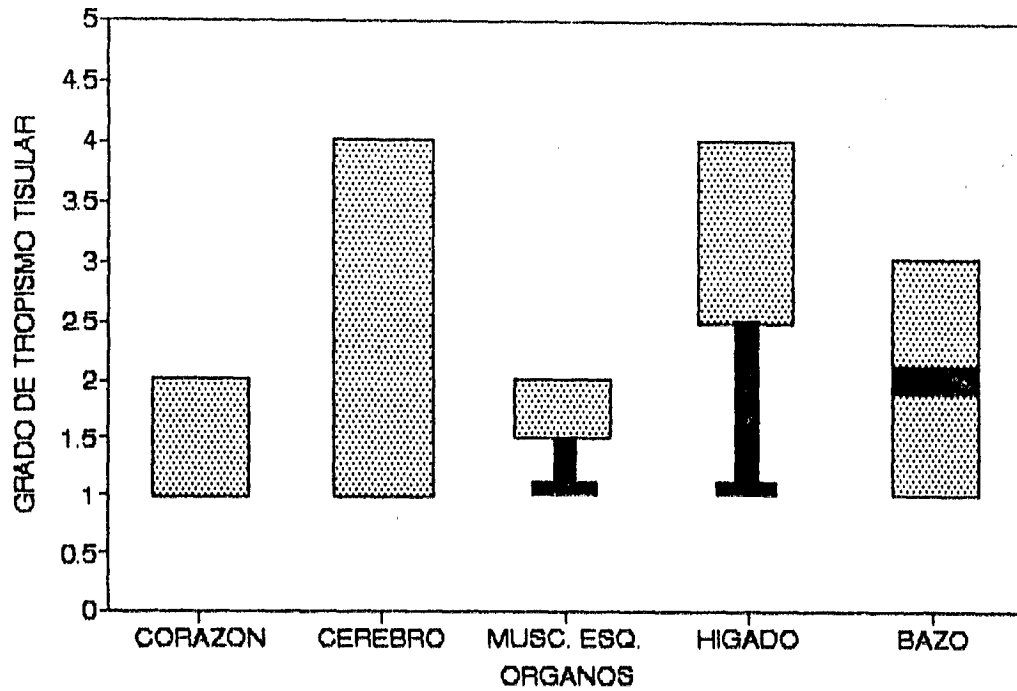
CI = Cepa I

CII = Cepa II

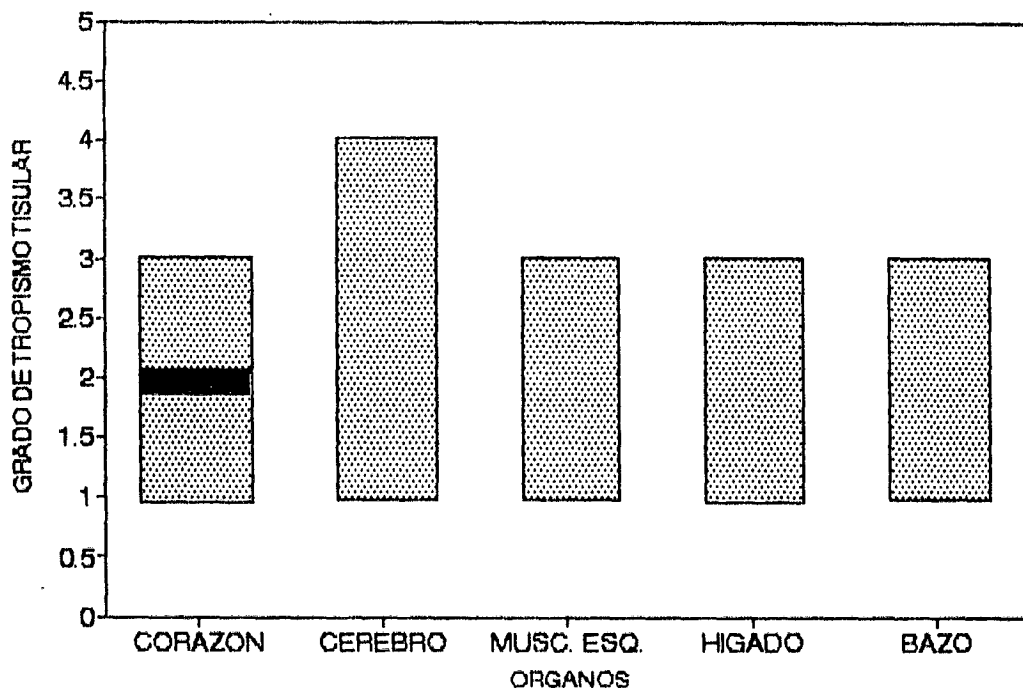
P. x T. = Parasitos por Tejido

\*\* = Se observaron amastigotes

**GRAFICA No. 1**  
**CANTIDAD DE PARASITOS ENCONTRADOS EN DIFERENTES ORGANOS**  
**1ra. SEMANA (CEPA I)**

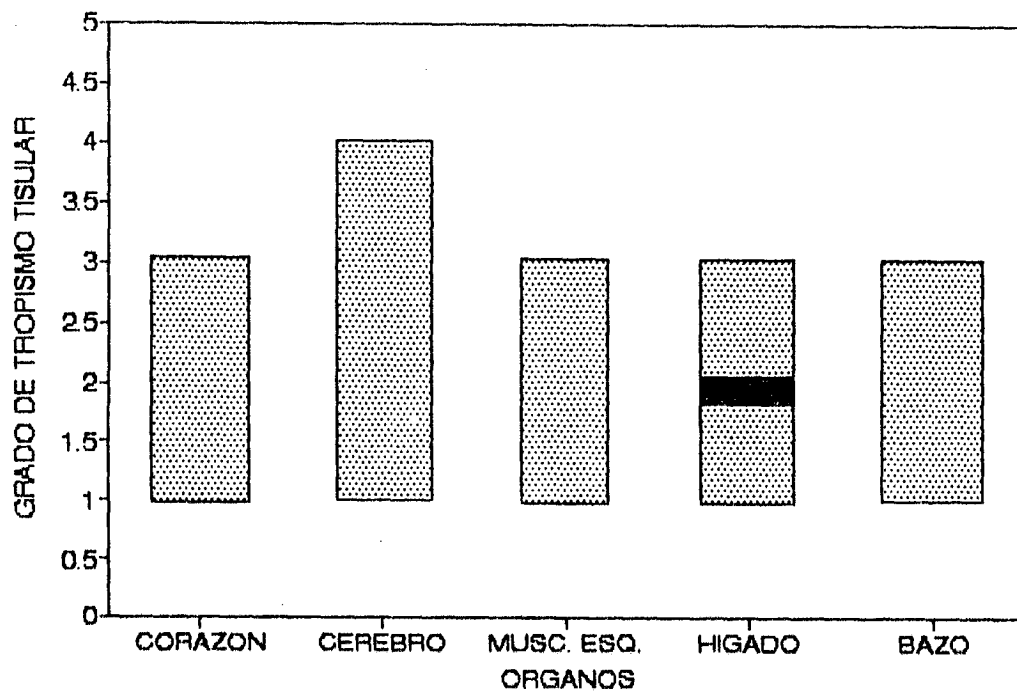


**GRAFICA No. 2**  
**CANTIDAD DE PARASITOS ENCONTRADOS EN DIFERENTES ORGANOS**  
**2da. SEMANA (CEPA I)**

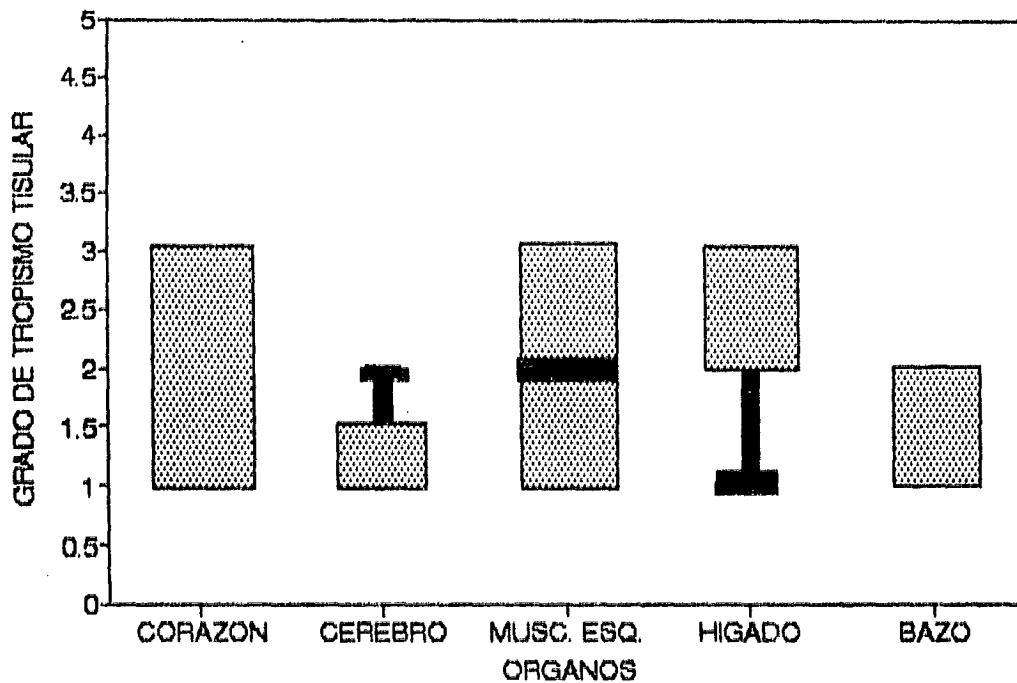




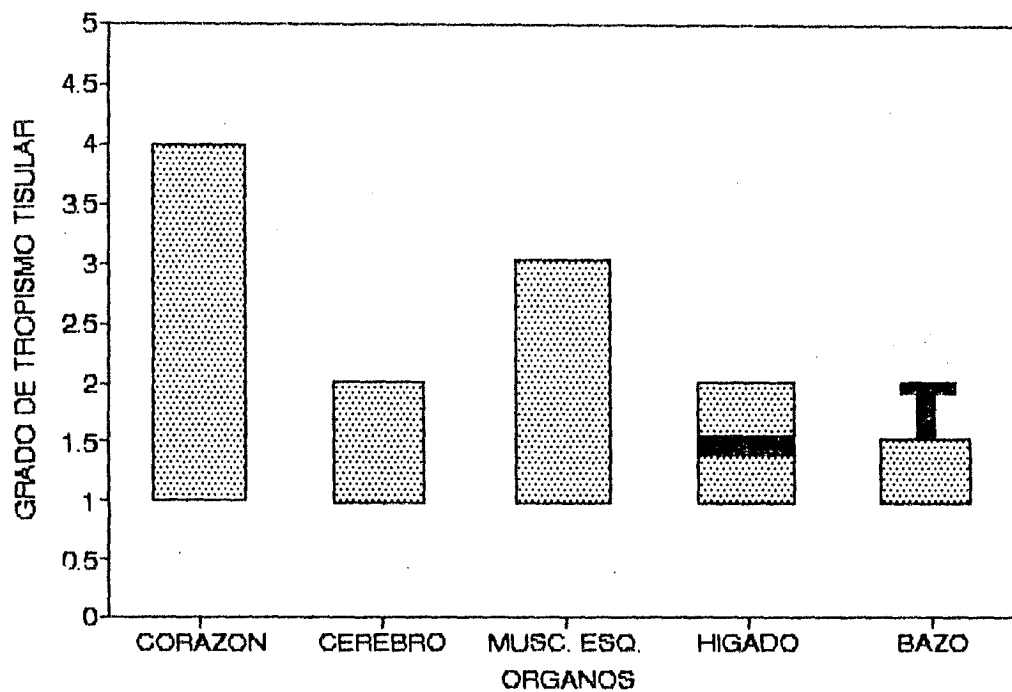
**GRAFICA No. 3**  
**CANTIDAD DE PARASITOS ENCONTRADOS EN DIFERENTES ORGANOS**  
**3ra. SEMANA (CEPA I)**



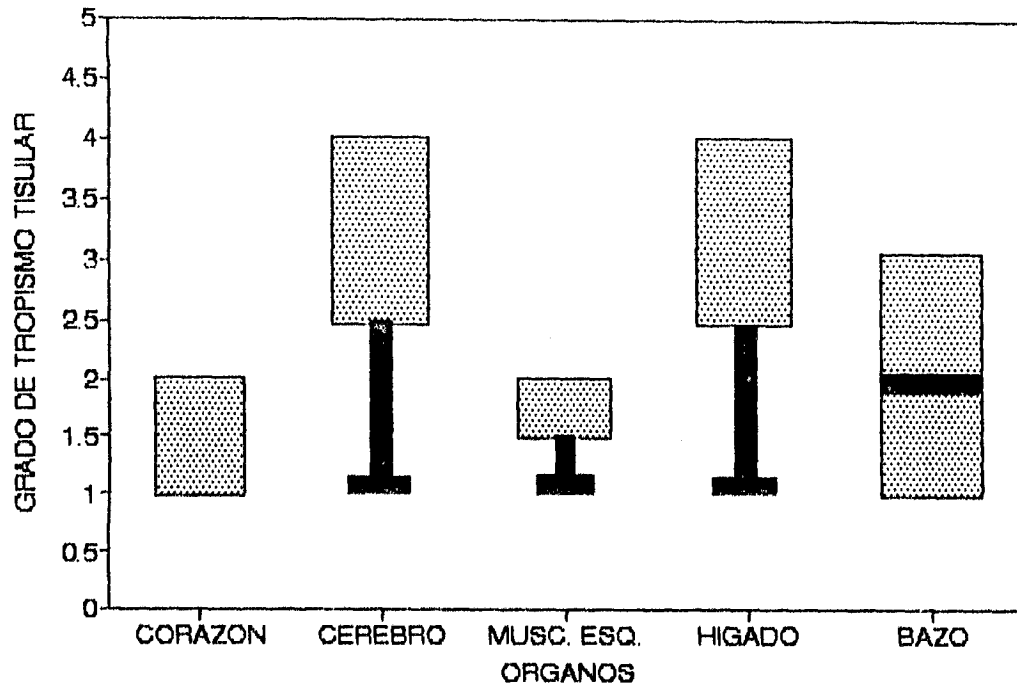
**GRAFICA No. 4**  
**CANTIDAD DE PARASITOS ENCONTRADOS EN DIFERENTES ORGANOS**  
**4ta. SEMANA (CEPA I)**



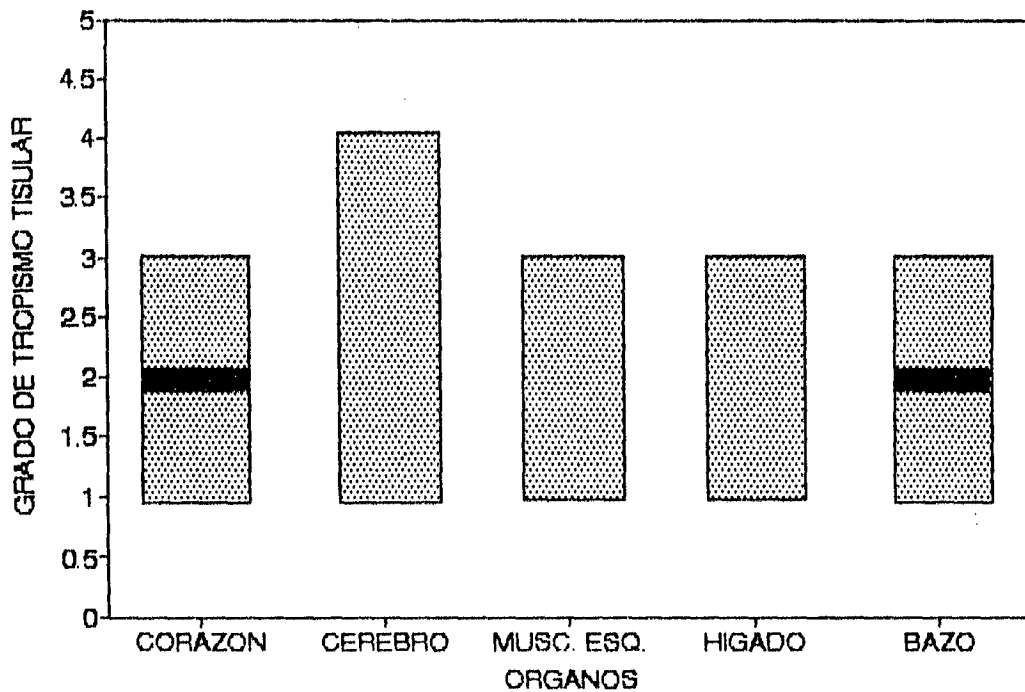
**GRAFICA No. 5**  
**CANTIDAD DE PARASITOS ENCONTRADOS EN DIFERENTES ORGANOS**  
**5ta. SEMANA (CEPA I)**



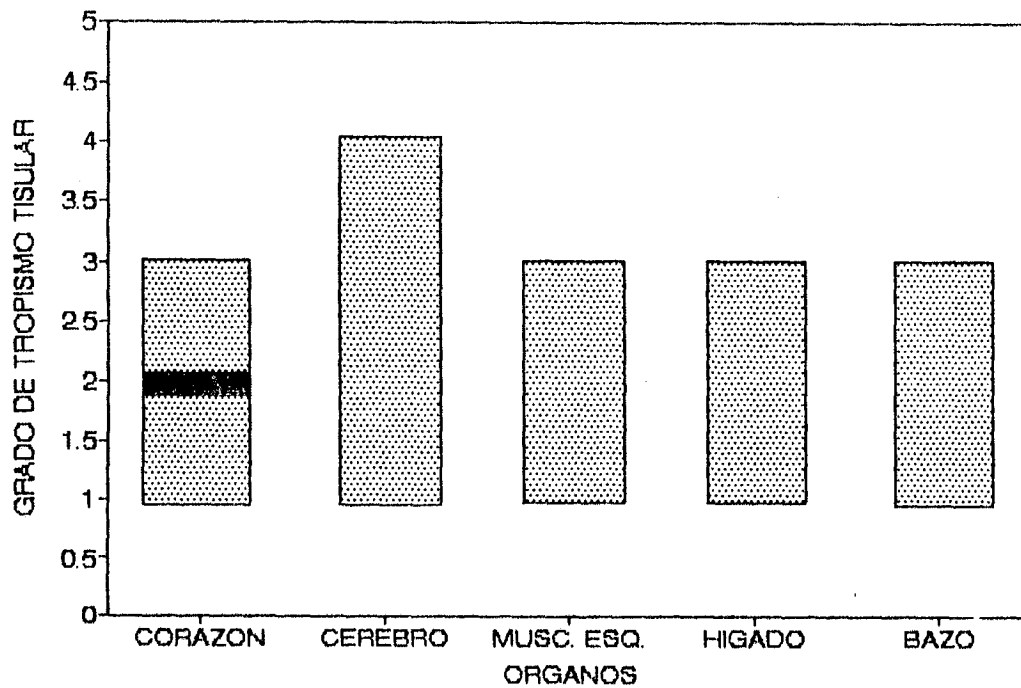
**GRAFICA No. 6**  
**CANTIDAD DE PARASITOS ENCONTRADOS EN DIFERENTES ORGANOS**  
**6ta. SEMANA (CEPA II)**



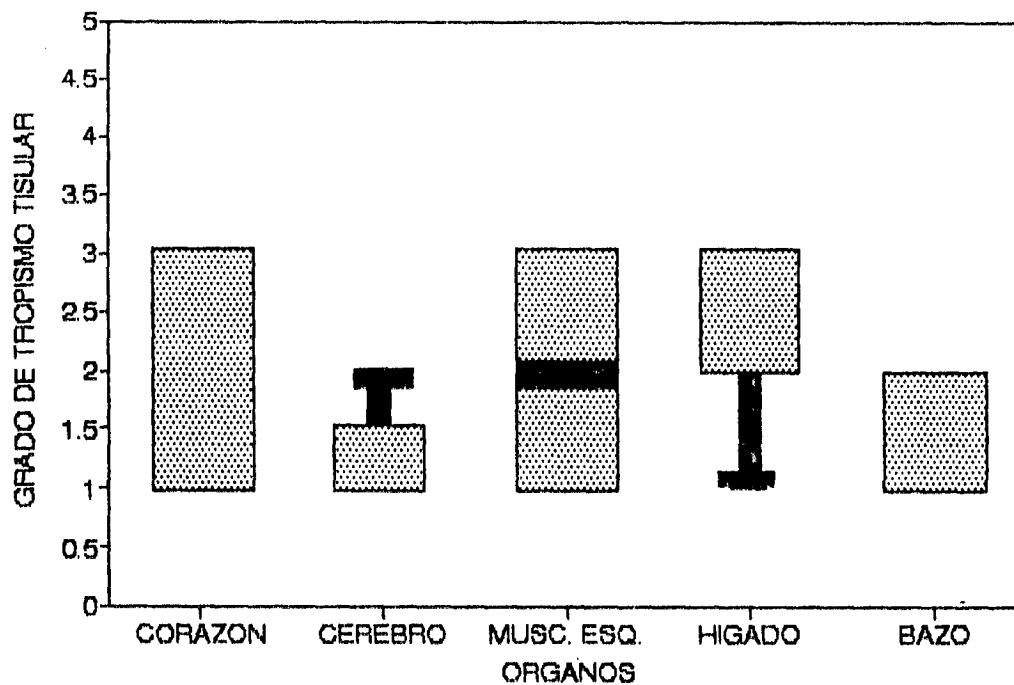
**GRAFICA No. 7**  
**CANTIDAD DE PARASITOS ENCONTRADOS EN DIFERENTES ORGANOS**  
**2da. SEMANA (CEPA II)**



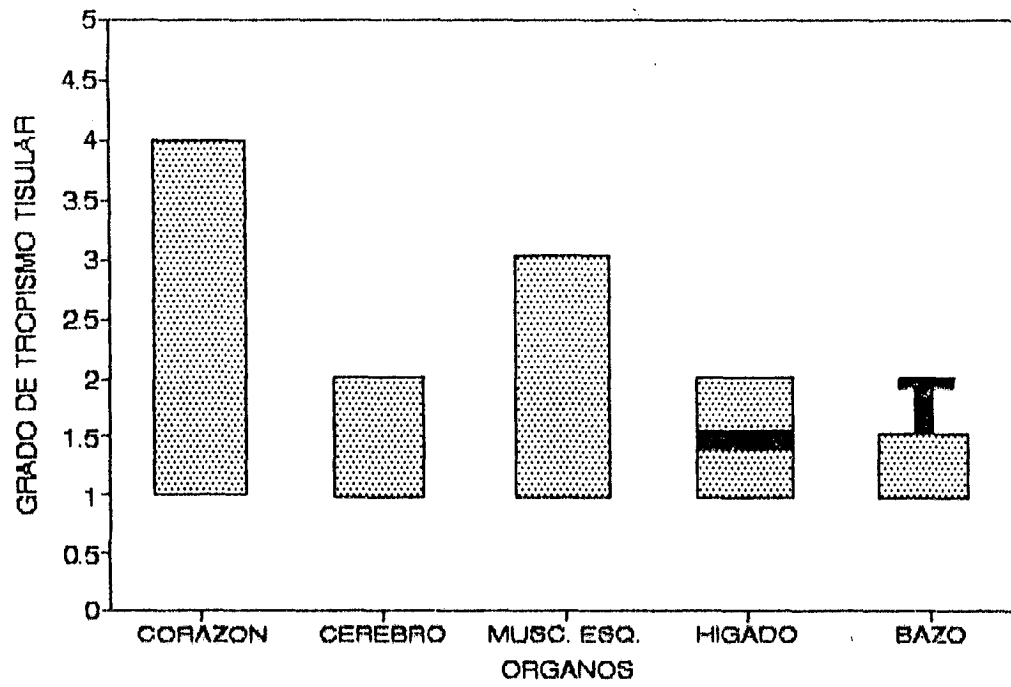
**GRAFICA No. 8**  
**CANTIDAD DE PARASITOS ENCONTRADOS EN DIFERENTES ORGANOS**  
**3ra. SEMANA (CEPA II)**

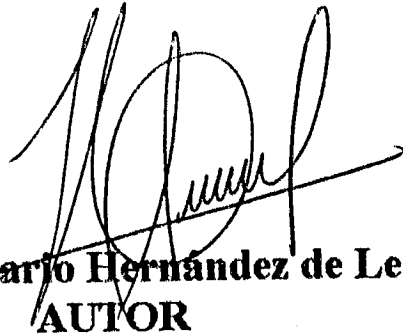


**GRAFICA No. 9**  
**CANTIDAD DE PARASITOS ENCONTRADOS EN DIFERENTES ORGANOS**  
**4ta. SEMANA (CEPA II)**

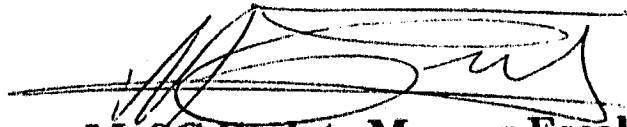


**GRAFICA No. 10**  
**CANTIDAD DE PARASITOS ENCONTRADOS EN DIFERENTES ORGANOS**  
**5ta. SEMANA (CEPA II)**

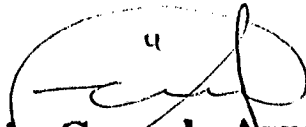




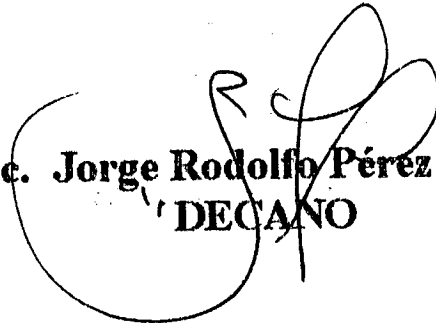
**Jorge Mario Hernández de León**  
**AUTOR**



**M. SC Carlota Monroy Escobar**  
**ASESORA**



**Lic. Gerardo Arroyo**  
**DIRECTOR**



**Lic. Jorge Rodolfo Pérez Folgar**  
**DECANO**