

Caracterización biológica de aislados mexicanos de *Trypanosoma cruzi*: metaciclogénesis, parasitemia y resistencia contra benznidazol

Víctor Monteón, Santiago Godínez, Guillermo Cruz-Zetina, Javier Balmes, Ruth López, Óscar Hernández

Centro de Investigación en Enfermedades Tropicales, Universidad Autónoma de Campeche, México

RESUMEN

Introducción. El protozooario parásito *Trypanosoma cruzi* está constituido por clonas y sus características biológicas, bioquímicas y genéticas varían entre ellas, de tal forma que las cepas de *T. cruzi* que se encuentran distribuidas en un país pueden ser distintas respecto a estas características.

Objetivo. Determinar características biológicas como porcentaje de metaciclogénesis *in vivo* e *in vitro*, parasitemia en modelo murino y resistencia natural al benznidazol en aislados mexicanos de *T. cruzi*.

Materiales y Métodos. Se analizaron 5 aislados de *T. cruzi*, provenientes de distintas regiones del país (Nayarit, Guerrero, Oaxaca, Veracruz y Campeche). Se determinó el grado de metaciclogénesis *in vitro* en medio LIT y metaciclogénesis *in vivo* en *Triatoma dimidiata*. La curva de parasitemia en ratones Balb/c y la resistencia natural al benznidazol utilizando tripomastigotes sanguíneos.

Resultados. La metaciclogénesis *in vitro* fue diferente entre los aislados; resultó más alta para los provenientes de Oaxaca y Nayarit; las más bajas para los aislados de Campeche y Guerrero; mientras que *in vivo* los aislados de Campeche, Veracruz y Oaxaca tuvieron la metaciclogénesis más alta y la más baja para los de Guerrero y Nayarit. La parasitemia en ratón fue muy similar entre ellos, con excepción del aislado proveniente de Nayarit

que fue baja. Se observó resistencia contra benznidazol superior al 50% para todos ellos.

Conclusiones. Los aislados de *T. cruzi* aquí probados, provenientes de diversas zonas geográficas del país, presentan características biológicas diversas. El porcentaje de metaciclogénesis difiere *in vitro* o *in vivo*; la metaciclogénesis en *T. dimidiata* no es mayor que 31%, independientemente del aislado de *T. cruzi*.

Palabras clave: *Trypanosoma cruzi*, metaciclogénesis, benznidazol, cepas mexicanas

ABSTRACT

Biological characterization of isolated Mexican of *Trypanosoma cruzi*: metaciclogenesis, parasitemia and resistance against benznidazol

Introduction. *Trypanosoma cruzi* has a multiclonal constitution, a feature that influence in its biological, biochemistry and genetic characteristics. In this way the strains distributed in a country may have their own profile.

Objective. To determine biological features such as metaciclogensis *in vitro* and *in vivo*, parasitemia in mice and natural resistance to benznidazol in Mexican *T. cruzi* isolates.

Materials and Methods. Five *T. cruzi* isolates coming from different zone of Mexico (Nayarit,

Solicitud de sobretiros: Dr. Víctor Monteón, Centro de Investigación en Enfermedades Tropicales, Patricio Trueba s/n, Colonia Linda Vista, Campeche, Campeche, México. CP 24030. Tel/fax 981-81-30176. E-mail: victormonteon@yahoo.com.mx

Recibido: el 25 de junio de 2009. **Aceptado para publicación:** el 23 de noviembre de 2009

Este artículo está disponible en <http://www.revbiomed.uady.mx/pdf/rb092035.pdf>

Monteón *et al.*

Guerrero, Oaxaca, Veracruz y Campeche) were studied. *In vitro* metaciclogenesis was determined in LIT medium, *in vivo* metaciclogenesis in infected *Triatoma dimidiata*, virulence in infected Balb/c mice and natural resistance to benznidazol using blood stream trypomastigotes.

Results. The metaciclogenesis *in vitro* was higher for Oaxaca and Nayarit isolates, whereas for the Campeche and Guerrero showed the lowest metaciclogenesis rate. But *in vivo* the isolates from Campeche, Veracruz y Oaxaca had higher metaciclogenesis than Guerrero isolate. The parasitemia in mice was similar among of them with exception for Nayarit isolate showing low parasitemia. Natural resistance to benznidazol was above 50% in the five isolates.

Conclusions. Mexican *T. cruzi* isolates here tested had different biological behaviour. The metaciclogenesis for each isolate differs *in vivo* or *in vitro* assay. In *T. dimidiata* the metaciclogenesis was below 30% independently of *T. cruzi* isolate.

Key words: *Trypanosoma cruzi*, drug resistance, metaciclogenesis, Mexican isolates

INTRODUCCIÓN

El parásito *Trypanosoma cruzi* está conformado por una población muy heterogénea de individuos con un comportamiento clonal (1,2), que dan origen a diversas cepas que se distribuyen en distintas zonas geográficas. Las clonas que mejor se adapten a la especie del insecto vector y que tengan mayor capacidad de metaciclogenesis serán las que puedan infectar más eficientemente al reservorio mamífero o al hombre; asimismo, las de mayor virulencia en el hospedero mamífero generarán parasitemias suficientes para asegurar su paso al insecto vector transmisor (3-5).

En México, se ha observado que las características biológicas de los parásitos pueden variar ampliamente entre ellas, como virulencia, metaciclogenesis, zimodemos, esquizodemos y perfiles antigénicos (6,7). Los trabajos recientemente publicados señalan además que la

metaciclogenesis varía de acuerdo con el vector involucrado, de tal forma que en *Triatoma barberi* se puede generar hasta 76% de metacíclicos, en *T. pallidipennis* 15% y en *T. dimidiata* 26% (8). Otra característica que también se ha observado que varía es la concerniente a su virulencia en modelo murino. Espinoza *et al.* (6) encontraron que, de 5 aislados mexicanos de *T. cruzi* probados en modelo murino, tres de ellos poseían baja capacidad para matar al animal en la fase aguda entre 25-30% y los otros dos mataban entre 80-90% de los ratones. Recientemente, se observó que la susceptibilidad a la lisis por complemento y la resistencia contra benznidazol *in vitro* de aislados mexicanos de *T. cruzi* varían en función de la cepa, observándose susceptibilidad a la lisis por complemento desde 50% a 99% y resistencia contra benznidazol desde 60% a 100% en la fase de epimastigote (9).

Se ha observado en Sudamérica que la resistencia contra benznidazol varía entre cepas e, incluso, entre las clonas que conforman una cepa (10).

En México, se han llevado a cabo diversos estudios para la identificación del linaje de *T. cruzi*, el cual se ha visto que pertenece al linaje I (9,11,12). De los estudios publicados sobre resistencia contra benznidazol, sólo han sido probados en las formas no infectivas del parásito. Por todo ello, el objetivo de este trabajo es aportar información complementaria a la existente, analizando tres características importantes del parásito, como son su capacidad de metaciclogenesis, su parasitemia en modelo murino y la resistencia natural contra benznidazol en las formas infectivas para el humano.

MATERIALES Y MÉTODOS

Parásitos

Se utilizaron los siguientes aislados: INC1 aislado de un caso crónico con cardiopatía chagásica (CCC) de Oaxaca, INC7 aislado de paciente con CCC de Veracruz, INC9 aislado de un paciente con CCC de Guerrero, Camp7 aislado de *T. dimidiata* en la cd de Campeche y Nayarit aislado de *T. picturata* en la ciudad de Tepic, que de acuerdo con la nomenclatura estandarizada serían:

Caracterización de aislados mexicanos de *T. cruzi*

MHOM/MX/1994/INC1; MHOM/MX/2001/INC7; MHOM/MX/2001/INC9; P/MX/2007/Camp7, PIR/MX/0000/Nayarit, respectivamente. Todos los aislados son conservados en cultivo LIT (Liver Infusion Tryptose) y en ratón con pases periódicos.

Metaciclologénesis *in vitro*. Se depositó en 50 mL de medio de cultivo LIT un inóculo de parásitos equivalente a 50×10^6 epimastigotes de *T. cruzi*, de los distintos aislados; esta suspensión fue incubada a 28°C y cada 48 h se tomaron alícuotas para analizar en la cámara de Neubauer las formas epimastigotes y tripomastigotes de *T. cruzi* y la cuenta total. Todo se realizó por triplicado. No se consideraron las formas intermedias. Los criterios fueron puramente morfológicos y tipo de movimiento de los parásitos.

Metaciclologénesis *in vivo*. Se alimentaron 3 ninfas de *Triatoma dimidiata* sobre ratones previamente infectados con los diferentes aislados de *T. cruzi*. Semanalmente se revisaron los triatomas infectados con los diferentes aislados, para ello se tomó una alícuota de las deyecciones recolectadas y se realizó el conteo en un hemocitómetro Neubauer para identificar y cuantificar las formas epimastigotes y tripomastigotes. Los criterios fueron los mismos, anteriormente señalados.

Curva de parasitemia. Se obtuvieron formas metacíclicas de cultivo de cada aislado de *T. cruzi*. Se infectó un lote de 5 ratones Balb/c vía intraperitoneal con una suspensión de parásitos que contuviera 5×10^5 formas metacíclicas. La parasitemia se vigiló cada tercer día y, para ello, se obtuvo sangre periférica de la vena caudal del ratón. La cuantificación de las formas sanguíneas de *T. cruzi* se realizó con el método Brener.

Susceptibilidad *in vitro* de *Trypanosoma cruzi* a benznidazol y a violeta de genciana. A partir de sangre de ratones infectados con los diferentes aislados de *T. cruzi*, se obtuvo la cantidad de

tripomastigotes sanguíneos necesaria para realizar el ensayo en microplaca. Se depositó un volumen de sangre infectada con *T. cruzi* equivalente a 50,000 parásitos por pozo y se agregaron 2.5 μ L de una suspensión de Benznidazol para tener una concentración final de 100mg/mL y cantidad necesaria de medio RPMI (Roswell Park Memorial Institute) hasta completar un volumen de 250 μ L. De igual manera, en otros pozos de la placa, se agregó el mismo volumen de sangre con parásitos requeridos y medio RPMI, sustituyendo el benznidazol por 2.5 μ L de solución salina; éste fue el control negativo del ensayo. Similarmente, el control positivo del ensayo consistió en sangre conteniendo la misma concentración de parásitos y medio RPMI, pero sustituyendo el benznidazol por 2.5 μ L de violeta de genciana. Se determinó el porcentaje de susceptibilidad cuantificando el número de tripomastigotes viables en las muestras con droga respecto a su correspondiente control. Las observaciones de realizaron a las 24 horas de cultivo. Todos los ensayos se hicieron por triplicado.

Análisis estadístico. Se aplicó estadística descriptiva, a fin de obtener los valores promedios para la representación gráfica de la cinética de crecimiento de *T. cruzi*; así también, análisis de varianza con posprueba de Bonferroni, con un intervalo de confianza de 95%, utilizando el software Graphpad Prism versión 4.0.

RESULTADOS

Metaciclologénesis *in vitro*

El crecimiento *in vitro* de *T. cruzi* manifestó un comportamiento variable entre los diferentes aislados. La fase estacionaria se ubicó hacia los días 10-12 de cultivo. La mayor concentración de parásitos alcanzada fue de 38×10^6 parásitos/ml y correspondió al aislado procedente de Veracruz y la más baja fue de 12×10^6 parásitos/ml que correspondió al aislado procedente de Campeche (datos no mostrados). El porcentaje de metaciclologénesis también fue diferente, dependiendo del aislado en cuestión; así, el aislado procedente de Oaxa-

ca (INC1) alcanzó los porcentajes más altos de diferenciación alrededor del 50%, mientras que el procedente de Guerrero (INC9) experimentó los más bajos, alrededor del 15% (**Figura 1**). Al realizar un análisis estadístico para comparar si las metaciclologénesis eran estadísticamente diferentes en función del aislado, encontramos que efectivamente hubo diferencia estadística como se muestra en la **Figura 2**, donde se observa que los aislados Camp7 y Nayarit se parecen entre ellos, pero que son diferentes al de Oaxaca (INC1) y Guerrero (INC9), y el procedente de Veracruz (INC7) fue muy diferente a todos los demás ($p < 0.05$).

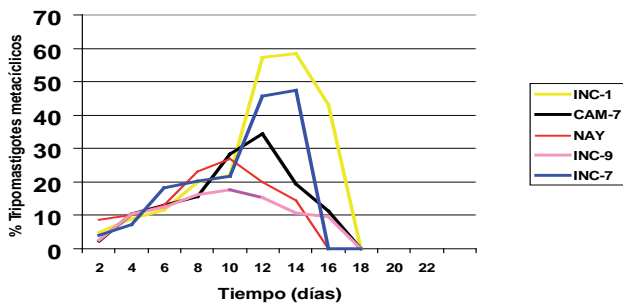


Figura 1. Cinética de transformación de tripomastigotes metacíclicos en medio de cultivo LIT

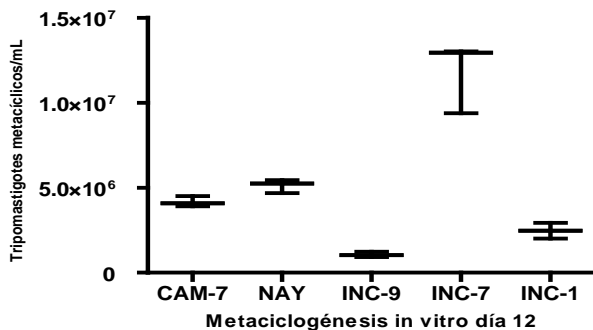


Figura 2. Comparación de metaciclologénesis en cultivo de distintos aislados de *Trypanosoma cruzi*

Metaciclologénesis *in vivo*

En el **Cuadro 1**, se observan los resultados correspondientes al proceso de diferenciación morfológica de *T. cruzi* en el triatoma; en ella los aislados procedentes de Veracruz (INC9) y Campeche (Camp7) presentaron el porcentaje más alto de diferenciación hacia las formas metacíclicas,

siendo alrededor de 30%; aunque todos los aislados presentaron porcentajes de diferenciación similares en las tres primeras semanas de infección. Hacia el día 49, las diferencias entre los aislados fueron más evidentes y, al realizar una prueba de ANOVA para comparar los resultados, observamos que los aislados de Campeche y Veracruz se parecen entre sí y son diferentes de los demás; los procedentes de Guerrero y Nayarit se parecen entre ellos y son diferentes a los otros con un valor de $p < 0.05$ (**Figura 3**).

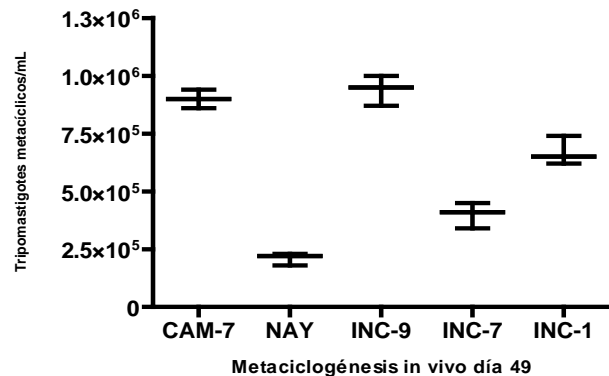


Figura 3. Comparación de la metaciclologénesis en *Triatoma dimidiata* infectada con distintos aislados de *Trypanosoma cruzi*

Curva de parasitemia

En los 5 aislados analizados, la presencia de tripomastigotes circulantes en sangre periférica se manifestó a partir del día 10 postinoculación (**Figura 4**).

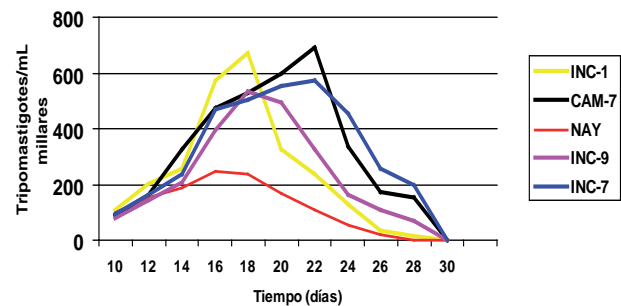


Figura 4. Curva de parasitemia en ratones Balb/c inoculados con distintos aislados mexicanos de *Trypanosoma cruzi*

Caracterización de aislados mexicanos de *T. cruzi*

Cuadro 1

Resultados de la metaciclologénesis en *Triatoma dimidiata* infectada con distintos aislados de *Trypanosoma cruzi*

DÍAS	CAM-7 (Campeche)	INC-1 (Oaxaca)	INC-7 (Veracruz)	INC-9 (Guerrero)	NAY (Nayarit)	<i>P</i>
7	8%	14.66%	12.60%	5.33%	10.66%	0.0290
14	21%	16%	17.33%	11.66%	19%	0.1425
21	29%	27.6%	23%	20.66%	20.6%	0.1117
28	31.33%	30%	29%	17.33%	25%	0.0046
35	26.33%	27%	16.6%	20%	17%	0.0030
42	28.66%	13%	24.33%	17.33%	20%	0.0004
49	30%	22.3%	13.3%	31.3%	7%	≤0.0001

El aislado originario de Campeche presentó el pico máximo de parasitemia más elevado (6×10^5 parásitos/mL), hacia el día 22 postinoculación. Los aislados provenientes de los estados de Oaxaca, Guerrero y Nayarit alcanzaron su pico máximo el día 18, aunque el procedente de Nayarit presentó la menor parasitemia.

Es importante destacar que no se observó mortalidad en la población de ratones infectados con los aislados mexicanos probados. Al medir y comparar la parasitemia hacia su pico máximo, que es la forma de medir la virulencia, encontramos que los aislados procedentes de Camp7 y Veracruz se parecen entre ellos, presentando las parasitemias más altas; mientras que los procedentes de Nayarit y Oaxaca (INC1) tuvieron las parasitemias más bajas y se parecen entre ellos (Figura 5).

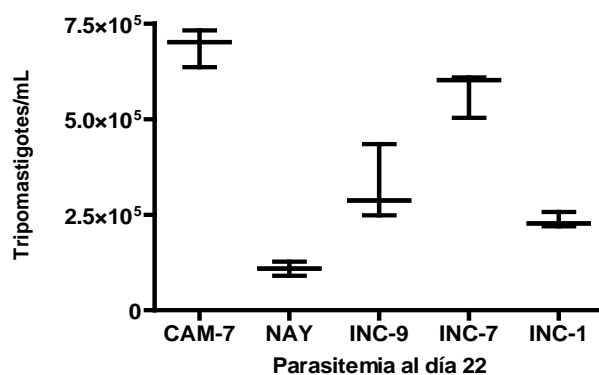


Figura 5. Comparación de la parasitemia de ratones Balb/c infectados con distintos aislados de *Trypanosoma cruzi*

Susceptibilidad *in vitro* de *Trypanosoma cruzi* a Benznidazol y violeta de genciana

En el Cuadro 2, se expresan los niveles de susceptibilidad a Benznidazol y violeta de genciana. El grado de sensibilidad a Benznidazol varió desde 33% hasta 57%. Los aislados que presentaron mayor resistencia contra benznidazol arriba de 50% fueron los procedentes de Campeche (Camp7) y de Veracruz (INC7). Todos los aislados fueron sensibles a la acción tripanocida del violeta de genciana.

DISCUSIÓN

En este trabajo encontramos que la metaciclologénesis *in vitro* varía dependiendo del aislado de *T. cruzi*, siendo más alto para el procedente de Oaxaca (INC1) alrededor de 50%, mientras que para el procedente de Guerrero (INC9) sólo fue de 15%. Estos valores se observaron hacia las dos semanas de cultivo. Lo anterior contrasta con los resultados de Contreras y colaboradores, quienes observaron el pico máximo de diferenciación entre el tercero y el sexto día después de iniciado el proceso de metaciclologénesis en ocho cepas de *T. cruzi* (13). De igual manera, Avendaño y colaboradores observaron la diferenciación morfológica en cepas costarricenses entre 72 y 96 horas postinoculación (14). Esta diferencia en la aparición temprana de metaciclologénesis *in vitro*, se puede explicar

Cuadro 2
Resistencia natural contra benznidazol y contra violeta de genciana en tripomastigotes sanguíneos de diferentes aislados mexicanos de *Trypanosoma cruzi*

Aislado	Benznidazol	Violeta de genciana
	% Resistencia	% Resistencia
CAM-7 (Campeche)	65	0
INC-1 (Oaxaca)	52	0
INC-7 (Veracruz)	67	0
INC-9 (Guerrero)	39	0
NAY (Nayarit)	43	0

porque nosotros empleamos medio LIT y ellos utilizaron medios definidos. Sin embargo, Sánchez y colaboradores emplearon cepas mexicanas de *T. cruzi* y utilizaron el mismo medio LIT, pero observaron metacicloogénesis muy pobre, por abajo de 10% (15). En este caso, es posible que el tamaño de inóculo inicial empleado haya influido, ya que nosotros utilizamos el doble de concentración de parásitos, o que efectivamente la metacicloogénesis es dependiente del tipo de cepa de *T. cruzi*.

Para tener datos que nos acerquen más a lo que sucede de manera natural, analizamos la metacicloogénesis *in vivo*, utilizando *T. dimidiata*, que es el principal transmisor de la enfermedad en la península de Yucatán y sur-centro de Veracruz. De acuerdo con los resultados obtenidos de metacicloogénesis *in vivo*, el aislado originario de Campeche, que fue aislado de *T. dimidiata*, arrojó una adaptación y un desarrollo más estable que los otros aislados, alcanzando porcentajes de diferenciación de hasta 31% hacia el día 28 y manteniéndose así hasta el último día de observación, que fue el día 49. En la mayoría de los aislados, de forma progresiva se fue incrementando la metacicloogénesis hacia el día 28, alrededor de 30%, pero hacia el día 49 el aislado procedente

de Nayarit cayó abruptamente; en cambio, el aislado procedente de Guerrero tuvo un repunte en esos mismos días de observación. Incluso, se pudo observar que en algunos aislados existieron oscilaciones en los valores de metacicloogénesis, a lo largo del tiempo de observación. Una posible explicación de este comportamiento pudiera ser que, en el caso del aislado de Campeche cuyo vector natural es *T. dimidiata*, éste logra el máximo de metacicloogénesis ya que los parásitos que componen esta cepa están mejor adaptados a dicho vector; en cambio, en los casos de Veracruz, Guerrero y Nayarit, algunas de sus clonas se fueron adaptando y otras desapareciendo, hasta que, finalmente, aquellas clonas que lograron colonizar más eficientemente el intestino permanecieron replicándose y diferenciándose a metacíclicos. Las clonas que componen el aislado Nayarit pareciera que no se adaptaron eficientemente, mientras que las provenientes de Guerrero al final lograron colonizar y transformarse más eficientemente en metacíclicos, lo que sugeriría que esta propiedad depende de la naturaleza del parásito.

En este sentido, Araujo y colaboradores infectaron larvas de *T. brasiliensis* con una cepa brasileña de *T. cruzi* y su respectivo clon;

Caracterización de aislados mexicanos de *T. cruzi*

observaron un porcentaje mayor de diferenciación en el clon con respecto a la cepa original (16).

Por otra parte, Perlowagora y colaboradores observaron que la metacicloogénesis también es un proceso dependiente del vector; ellos observaron 50% de transformación de *T. cruzi* en *Rhodnius neglectus*, 37% en *R. prolixus* y un porcentaje menor en las otras especies analizadas, como en *T. sordida* que fue 5%, en *T. brasiliensis* 3% y 0% en *T. pseudomaculata*, a los 120 días de infección (17). Análogamente, Carvalho y colaboradores observaron mayor metacicloogénesis en *R. neglectus* que en *T. pseudomaculata*, al estudiar las cepas Y y Berenice de *T. cruzi* (18).

En México, los trabajos recientemente publicados apoyan estos resultados, ya que encontraron que en *T. barberi* se puede alcanzar hasta 76% de metacicloogénesis, en *T. pallidipennis* 15% y en *T. dimidiata* 26% (8).

Así, nuestros datos apoyan la hipótesis de que la especie del vector es muy importante y determinante para la metacicloogénesis; mientras que el tipo de aislado o cepa de *T. cruzi* influye en menor grado, pero genera variación en la metacicloogénesis a lo largo del tiempo de infección del vector, ya que está constituido por diversas clonas; algunas tendrán mayor capacidad para colonizar a su hospedero vector y diferenciarse en metacíclicos y otras pudieran incluso desaparecer o quedar muy subrepresentadas.

Los porcentajes de metacicloogénesis máximos para *T. dimidiata*, observados en este trabajo, fueron de 30%, muy similar a lo publicado en Veracruz. Los mecanismos moleculares que regulan este proceso no están aún claramente dilucidados; pero se ha reconocido que las condiciones de estrés nutricional promueven la expresión de ciertos genes, entre los cuales figuran el MET I y el MET II, los cuales codifican proteínas propias de las formas metacíclicas de *T. cruzi* (14).

El biodemo es una forma de clasificar las distintas cepas de *T. cruzi*, que toma como variables el día del pico máximo de parasitemia, la

mortalidad de los ratones infectados y el tropismo tisular. El biodemo III está representado por las cepas colombianas, las cuales se multiplican lentamente, presentan picos de parasitemia entre los días 20 y 30 y una baja mortalidad en ratón (19). Nuestros datos muestran picos de parasitemia entre los días 20 y 30 y nula mortalidad durante la fase aguda; lo que pareciera indicar que los aislados mexicanos aquí probados pertenecen a este mismo biodemo, aunque hacen falta los estudios de tropismo histológico para asegurar que efectivamente son del biodemo III.

La virulencia, medida como la capacidad de replicación del parásito, indica que el aislado originario de Campeche fue el más virulento con una parasitemia de hasta 690,000 tripomastigotes/mL y que los aislados probados se diferencian respecto a esta característica, lo que apoya un comportamiento multiclinal de *T. cruzi*.

Otra variable biológica importante que se midió fue la heterogeneidad en los niveles de susceptibilidad al benznidazol entre los aislados mexicanos de *T. cruzi*, que variaron desde 33% (Oaxaca) hasta 61% (Guerrero); esta variabilidad concuerda con las diferencias en susceptibilidad a la acción farmacológica del benznidazol, reportada en cepas de *T. cruzi* cuando proceden de regiones geográficas diferentes. Es de llamar la atención que el aislado de Campeche, el cual proviene de triatoma, resultó el de mayor resistencia, mientras que los aislados de casos humanos resultaron más sensibles. No tenemos ningún dato experimental que nos ayude a sustentar una explicación para este fenómeno; pero es posible que en el hospedero humano haya un proceso de selección de clonas y que las seleccionadas resultaron ser más sensibles al benznidazol.

Veloso y colaboradores evaluaron la susceptibilidad a benznidazol y observaron 100% de resistencia en las cepas colombianas; mientras que las cepas brasileñas, Berenice y Berenice-78 tuvieron una sensibilidad de 50%, 70% y 100% a la acción tripanocida del fármaco, respectivamente (20). De igual manera, Filardi y colaboradores

reportaron niveles de susceptibilidad variable a la acción farmacológica del benznidazol, desde 0 hasta 100%, en varias cepas sudamericanas de *T. cruzi* (21).

En conclusión, podemos señalar que la capacidad de metaciclógenesis está condicionada por la especie de *Triatoma* junto con las características de *T. cruzi*. El grado de parasitemia y metaciclógenesis son factores importantes de adaptación que tiene *T. cruzi* para infectar tanto al hospedero mamífero como al invertebrado. Otro hallazgo relevante es la resistencia contra benznidazol encontrado en todos los aislados probados; este elemento tiene implicaciones importantes a la luz de las pocas alternativas terapéuticas existentes en la actualidad.

REFERENCIAS

1. **Deininger PL, GR. Daniels.** The recent evolution of mammalian repetitive DNA elements. *Trends Genet* 1986; 2:76-80
2. **Tibayrenc M, Kjellberg F, Ayala FJ.** A clonal theory of parasitic protozoa: the population structures of *Entamoeba*, *Giardia*, *Leishmania*, *Naegleria*, *Plasmodium*, *Trichomonas*, and *Trypanosoma* and their medical and taxonomical consequences. *Proc Natl Acad Sci* 1990;87: 2414-18.
3. **Da Silva F, Silva A.** Implications of genetic variability of *Trypanosoma cruzi* for the pathogenesis of Chagas disease. *Cad Saude Pública (Rio de Janeiro)* 2007; 23:2263-2274
4. **Gómez A, Monteón V.** Algunos aspectos de la organización y regulación genética en *Trypanosoma cruzi*: El agente etiológico de la enfermedad de Chagas. *Rev Lat-amer Microbiol* 2008;50:102-117
5. **Noireau F, Diosque P, Jansen A.** *Trypanosoma cruzi*: adaptation to its vector and its hosts. *Vet Res* 2009;40: 26-38
6. **Lopez-Olmos V, Pérez-Nesser V, Piñero D, Ortega E, Espinoza B.** Biological characterization and genetic diversity of mexicans isolates of *Trypanosoma cruzi*. *Acta Tropica* 1998; 69:239-254
7. **Espinoza B, Vera-Cruz J, González H, Ortega E, Hernández R.** Genotype and virulence correlation within Mexican stocks of *Trypanosoma cruzi* isolated from patients. *Acta Tropica* 1998;70:63-72
8. **Salazar-Schettino PM, de Haro-Arteaga I, Cabrera-Bravo M.** Importance of the three *Triatoma* vectors of *Trypanosoma cruzi* in Mexico. *Medicina (B. Aires)* 2005; 65: 63-9
9. **León-Pérez F, Gómez-García L, Alejandro-Aguilar R, López R, Monteón VM.** Mexican *Trypanosoma cruzi* isolates: In vitro susceptibility of epimastigotes to anti-*Trypanosoma cruzi* drugs and metacyclic forms to complement-mediated lysis. *Vector-Borne Zoonotic Diseases* 2007; 7:330-36
10. **Camandaroba E, Reis E, Goncalves M, Reis T, Andrade S.** *Trypanosoma cruzi*: susceptibility to chemotherapy with benznidazol of clones isolated from the high resistant Colombian strain. *Rev Soc Bras Med Trop* 2003;36:1-13
11. **Bosseno M, Barnabé C, Magallón-Gastelum E, Lozano-Kasten F.** Predominance of *Trypanosoma cruzi* I lineage in Mexico. *J Clin Microbiol* 2002; 40:627-632
12. **Ruíz-Sánchez R, de León P, Matta V, Reyes P, Monteón V.** *Trypanosoma cruzi* isolates from Mexican and Guatemalan acute and chronic chagasic cardiopathy patients belong to *Trypanosoma cruzi* I. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2005; 100:281-83
13. **Contreras VT, Salles J. M, Morel C. M.** *In vitro* differentiation of *Trypanosoma cruzi* under chemical defined conditions. *Mol Biochem Parasitol* 1985;16: 315-327.
14. **Avendaño A, Calderon-Arguedes O, Valeria L.** Heterogeneidad en la metaciclógenesis *in vitro* de clones derivados de una cepa costarricense de *Trypanosoma cruzi* (*Kinetoplastida: Trypanosomatidae*) *Parasit Lat* 2006; 61:12-6
15. **Sanchez-Guillen MC, Bernabe C, Tibayrenc M, Zavala-Castro J.** *Trypanosoma cruzi* strains isolated from human, vector and animal reservoir in the same endemic region in Mexico and typed as *T. cruzi* I, discrete Typing unit 1 exhibit considerable biological diversity. *Mem I Oswaldo Cruz*, 2006;101: 585-590
16. **Araujo CA, Wanier PJ, Jansen AM.** Development of *Trypanosoma cruzi* (TcI) isolate in the digestive tract of a unifamiliar vector *Triatoma brasiliensis* (Hemiptera, *Reduviidae*). *Acta Trop* 2008;107:195-99
17. **Perlowagora SA, Moreira CJ.** In vivo differentiation of *Trypanosoma cruzi*: Experimental evidence of the influence of vector species on metaciclógenesis. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1994;89:603-618
18. **Carvalho CJ, Sputa MG, Coura J, García ES, Azambuja P, Gonzales MS, Mello C B.** In vivo and *in vitro* metacyclogenesis test of two strains of *Trypanosoma cruzi* in the triatomino vectors *Triatoma pseudomaculata* and *Rhodnius neglectus*: short/long term and comparative studies. *Exp Parasitol* 2003;103:102-11
19. **Andrade SG.** Morphological and behavioral characterization of *Trypanosoma cruzi* strains. *Rev Soc Bras Med Trop* 1985;18:39-46
20. **Veloso VM, Carneiro CM, Toledo MJ, Lana M, Tefuri WL.** Variation in susceptibility to Benznidazole

Caracterización de aislados mexicanos de *T. cruzi*

in isolates derived from *Trypanosoma cruzi* parenteral strains. Mem I Oswaldo Cruz 2001; 96:1005-1011
21. Filardi LS, Vera-Cruz JM, Gonzalez H, Ortega F, Hernan-

dez R. Susceptibility and natural resistance of strains to drugs used clinically in Chagas disease. Rev Soc Trop Med Hyg 1987; 81:755-59