

Rev Biomed 1999; 10:177-184.

Importancia de la caracterización de cepas de Trypanosoma cruzi.

Revisión

Eugenia del S. Guzmán-Marín, Jorge E. Zavala-Castro, Karla Y. Acosta-Viana, María E. Rosado-Barrera.

Laboratorio de Biología Celular, Centro de Investigaciones Regionales "Dr. Hideyo Noguchi", Universidad Autónoma de Yucatán, Mérida, Yucatán, México.

RESUMEN.

El *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*) es un protozoo hemoflagelado, considerado el agente causal de la enfermedad de Chagas y es transmitido a los hospederos mamíferos por medio de insectos vectores del género *Triatoma*. El *T. cruzi* presenta un pleomorfismo natural, al cual se ha atribuido a la diferencia de severidad con que se presenta la enfermedad en el hospedero humano y otros mamíferos. Considerando este aspecto han sido varios los trabajos sobre caracterización de cepas de *T. cruzi*, abarcando aspectos biológicos, bioquímicos y moleculares para poder establecer un método de clasificación de las diferentes cepas de dicho parásito, de manera que las cepas que pertenezcan a un mismo grupo compartan estos aspectos y así una cepa pudiera ser representativa de ese grupo, simplificando los estudios a realizar.

Esta revisión pretende dar un panorama de los diferentes métodos de caracterización de las

cepas de *T. cruzi*, para tratar de agruparlas para su mejor estudio y control.

(Rev Biomed 1999; 10:177-184)

Palabras clave: caracterización biológica, *Trypanosoma cruzi*, enfermedad de Chagas.

SUMMARY.

The importance of the characterisation of *Trypanosoma cruzi* strains.

Trypanosoma cruzi (*T. cruzi*) is haemoflagellate protozoo considered to be the causal agent of Chagas' disease and it is transmitted to its mammalian host by insect vectors of the genus *Triatoma*. *T. cruzi* presents a natural pleomorphism which is believed to be responsible for the difference in severity in which the disease occurs in the human host compared to other mammals. Considering this aspect, there are various studies on the characterisation of the strains of *T.*

Solicitud de sobretiros: Eugenia del S. Guzmán-Marín, Laboratorio de Biología Celular, Centro de Investigaciones Regionales "Dr. Hideyo Noguchi", Universidad Autónoma de Yucatán, Av. Itz'áes No. 490 x 59, C.P. 97000, Mérida, Yucatán, México.

Recibido el 20/Febrero/1998. Aceptado para publicación el 18/Enero/1999.

Este artículo esta disponible en <http://www.uady.mx/~biomedic/rb991037.pdf>

Vol. 10/No. 3/Julio-Septiembre, 1999

cruzi, covering biological, biochemical and molecular aspects of the protozoan, in order to establish a method of classification of the different strains of *T. cruzi*. In this way, the strains which belong to one group share these aspects and therefore one strain could represent that group, simplifying the studies to be carried out.

This review aims to give a panorama of the different methods to characterisation of *T. cruzi*, in order to attempt to group them for a better study and control. (*Rev Biomed* 1999; 10:177-184)

Key words: Biological characterisation, *Trypanosoma cruzi*, Chagas' disease..

INTRODUCCION.

El *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*), protozooario hemoflagelado perteneciente a la familia de los Tripanosomatideos, incluidos en el orden de los Kinetoplastidos, es el agente causal de la Tripanosomiasis Americana, conocida también como enfermedad de Chagas (1). El parásito fue aislado por primera vez en Brasil por Carlos Chagas en el año de 1909, de las heces de insectos triatomínicos, los cuales son los transmisores, tanto en humanos como en animales (2).

La Tripanosomiasis Americana o Enfermedad de Chagas es una enzootia que se encuentra ampliamente distribuida en el Continente Americano, desde el sur de los Estados Unidos hasta Chile y Argentina y, en algunos países de las Antillas. La Organización Mundial de la Salud reporta que unos 100 millones de personas se encuentran expuestas a contraer la infección y el número de personas infectadas es de 16 a 19 millones (3,4).

La diferencia en cuanto a la severidad de la enfermedad en el hospedero humano y en otros mamíferos, se ha atribuido al pleomorfismo natural que presenta *T. cruzi*, el cual se demuestra al estudiar sus aspectos biológicos, bioquímicos y moleculares. Así, se han encontrado grandes diferencias en el comportamiento de las cepas tan-

to "*in vitro*" como "*in vivo*", y se han descrito posibles implicaciones del vector en la modulación de la virulencia de las cepas (5-8).

Esta variabilidad en su comportamiento biológico y la heterogeneidad que presenta en su caracterización bioquímica y molecular, han impedido establecer parámetros adecuados para su clasificación y taxonomía, lo que ha hecho que su caracterización sea una condición necesaria para su estudio y control (9).

GENERALIDADES.

T. cruzi presenta cuatro estadios morfológicos: tripomastigote metacíclico, promastigote o tripomastigote sanguíneo, epimastigote y amastigote.

El tripomastigote metacíclico es flagelado, alargado con un gran núcleo central, cinetoplasto de gran tamaño y el blefaroplasto posterior de donde surge un flagelo que contornea una membrana ondulante, que le confiere movimiento. Este estadio presenta deficiente capacidad de reproducción y es la forma que penetra e infecta al hospedero.

El promastigote o tripomastigote sanguíneo es flagelado, alargado, con el cinetoplasto grande alejado de la parte anterior del núcleo; similar al estadio anterior, puesto que también presenta flagelo y membrana ondulante. Este estadio se encuentra en la sangre y no tiene capacidad para dividirse, pero sí la tiene para invadir otras células.

El epimastigote es fusiforme, con un flagelo que forma una membrana ondulante que nace del blefaroplasto. El cinetoplasto se encuentra cercano a la parte anterior del núcleo que se encuentra en posición central. Este estadio presenta división binaria longitudinal.

El amastigote es de forma redondeada llamada leishmanoide, carece de flagelo y por lo tanto de movimiento; tiene un gran núcleo cerca del cual se encuentra el cinetoplasto a manera de disco. Tiene capacidad de replicación, por división binaria simple (10,11) (fig. 1).

Caracterización de cepas de Trypanosoma cruzi.

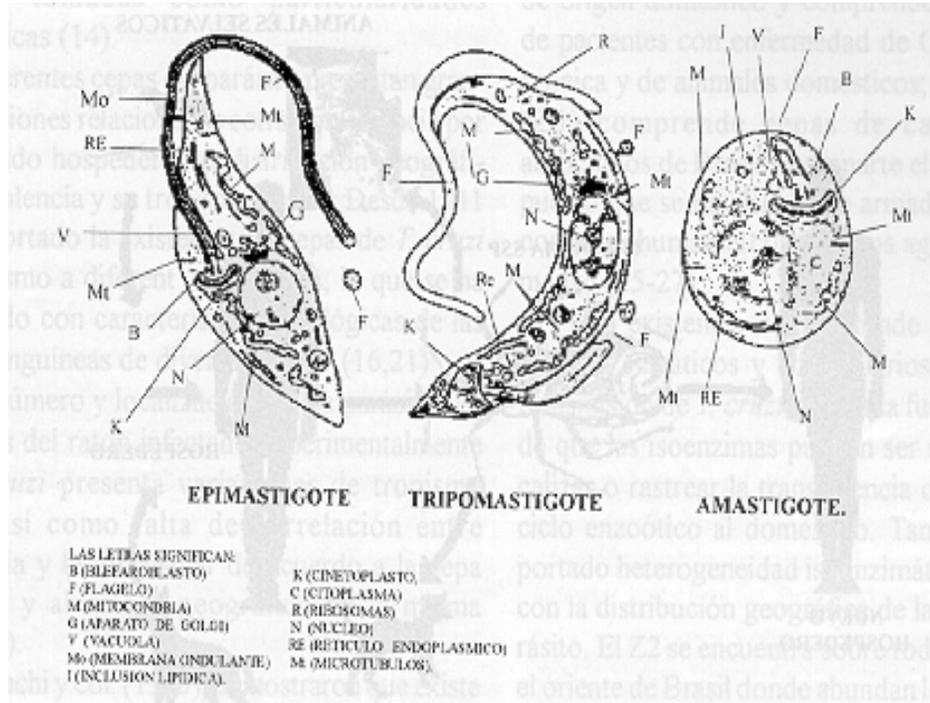


Figura 1.- Estadios morfológicos de *T. cruzi*.

CICLO DE VIDA.

El ciclo de vida de *T. cruzi* se desarrolla en organismos diferentes (insecto vector y mamífero hospedero), presentando en cada uno de ellos, una fase con dos estadios (12).

En el vector se encuentran los epimastigotes y los tripomastigotes metacíclicos y en el hospedero mamífero se encuentran los amastigotes y los tripomastigotes sanguíneos.

Los tripomastigotes sanguíneos son ingeridos por el vector al alimentarse de los mamíferos infectados, transformándose en formas cortas en el estómago del insecto, de donde migran hacia el intestino medio, donde continúan desarrollándose al encontrar un ambiente adecuado para transformarse en epimastigotes. Estos llegan a la porción posterior del intestino del vector donde evolucionan a tripomastigotes metacíclicos, forma que penetra e infecta al hospedero mamífero.

Los tripomastigotes metacíclicos son eliminados por el insecto en las heces, penetrando al hospedero y a las células de este, donde se transforma a la forma de amastigote. En el interior de la célula evoluciona nuevamente a tripomastigotes,

los cuales se liberan al torrente sanguíneo (13-15) (fig. 2).

CARACTERIZACIÓN DE CEPAS DE TRYPANOSOMA CRUZI.

El *T. cruzi* comprende un conjunto de poblaciones de cepas que circulan entre vectores, hombre y reservorios, tanto domésticos como selváticos. Se han realizado aislamientos del parásito de diversos hospederos, demostrándose una gran variación intraespecífica en cuanto a diferencias morfológicas de las formas sanguíneas, virulencia, habilidad para inducir lesiones, susceptibilidad para agentes quimioterapéuticos, constitución antigénica y capacidad de infección para células hospederas (16).

El comportamiento del parásito puede estar influenciado por el mismo hospedero o las condiciones del medio ambiente, lo que ha incrementado la tendencia a realizar una caracterización de las diferentes cepas de *T. cruzi*. Así mismo, uno de los problemas planteados consiste en saber si las diferencias que se observan en la presentación de los cuadros clínicos y en la respuesta de los pa-

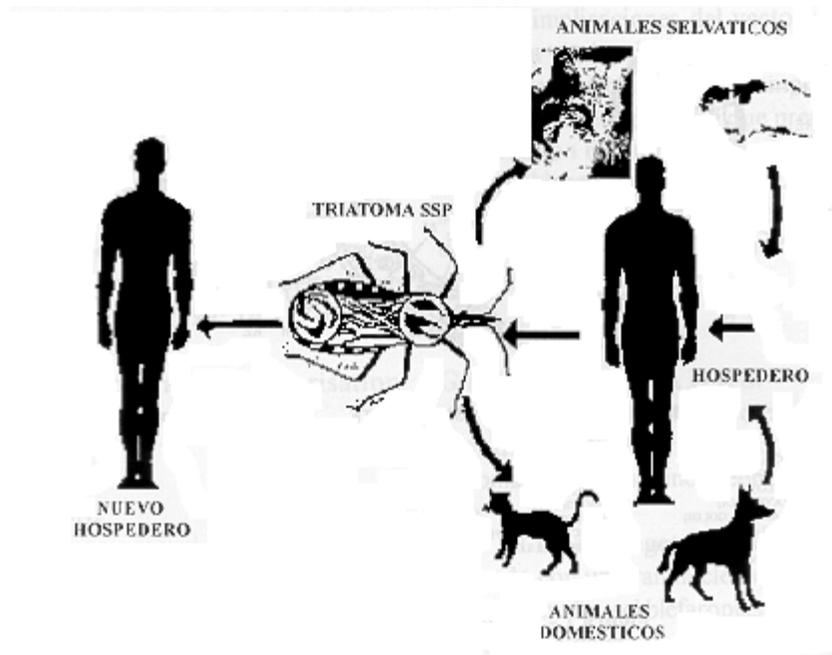


Figura 2.- Ciclo biológico de *Trypanosoma cruzi*.

cientes al tratamiento, se debe a las diferencias biológicas entre las cepas de *T. cruzi* que prevalecen en cada área geográfica, o a las diferencias genéticas entre las poblaciones humanas susceptibles (17). Por otro lado, se han identificado por varios métodos la marcada heterogeneidad a niveles bioquímico y molecular de las diferentes cepas del parásito, así como la variabilidad en su comportamiento biológico para correlacionar con los hallazgos clínicos y epidemiológicos (18,19).

CARACTERIZACIÓN BIOLÓGICA.

Desde 1950 se han realizado estudios en diferentes cepas del parásito, lo que ha permitido establecer que el *T. cruzi* que proviene de diferentes transmisores, reservorios y regiones del mismo país, se comportan diferente al infectar experimentalmente animales de laboratorio. Estas diferencias se manifiestan en los niveles de parasitemia e invasión a ciertos órganos, así como

a diferencias en las infecciones que el parásito ocasiona tanto en animales como en humanos, causando desde daños leves hasta la muerte. Este comportamiento tan variado se ha atribuido a múltiples causas como: factores ambientales, inmunidad, virulencia, patogenicidad, y el paso por diferentes especies de transmisores y hospederos (8,20).

Diversos estudios sugieren que la virulencia de *T. cruzi*, en los que se ha demostrado que depende del número de tripomastigotes inoculados, sin embargo Mazzotti (1940) atribuye la virulencia a la susceptibilidad del hospedero al parásito y Phillips (1960) lo atribuye a la localización y multiplicación del parásito en los tejidos infectados (16,19).

Petana y cols (1967) observaron variaciones biométricas de las formas sanguíneas de los tripanosomas entre las diferentes cepas del parásito, y entre el hombre y diversas especies de animales, sin embargo estas variaciones no pueden ser

Caracterización de cepas de *Trypanosoma cruzi*.

consideradas específicas de especie sino sólo pueden ser tomadas como particularidades morfológicas (14).

Diferentes cepas del parásito presentan grandes variaciones relacionadas con su preferencia por determinado hospedero, su distribución geográfica, su virulencia y su tropismo tisular. Desde 1911 se ha reportado la existencia de cepas de *T. cruzi* con tropismo a diferentes órganos, lo que se ha relacionado con características fisiológicas de las formas sanguíneas de diversas cepas (16,21).

El número y localización de los parásitos en los tejidos del ratón infectado experimentalmente con *T. cruzi* presenta variaciones de tropismo tisular, así como falta de correlación entre parasitemia y lesión tisular de acuerdo a la cepa empleada y al origen geográfico de la misma (15,20,21).

Higuchi y col. (1993), demostraron que existe correlación entre la presencia de antígenos de *T. cruzi* y la severidad del infiltrado inflamatorio, exclusivamente en miocardio (22).

Postan y col. (1984), en un estudio con dos clones de *T. cruzi* obtenidas de poblaciones heterogéneas de parásitos, reporta que los factores genéticos tanto del hospedero como del parásito influyen en la infección (23,24).

CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA.

Otra forma de caracterizar las cepas de *T. cruzi* es por medio de métodos bioquímicos que permiten analizar los productos de expresión génica utilizando isoenzimas. La electroforesis (EF) de isoenzimas es uno de los métodos empleados para detectar diferencias entre enzimas con propiedades catalíticas similares pero con distinta estructura molecular, lo que permite agrupar cepas de acuerdo a sus perfiles isoenzimáticos idénticos, que reciben el nombre de zimodemos.

Miles y col. (1981) introdujeron la técnica de los perfiles isoenzimáticos en el estudio de *T. cruzi* identificando 3 zimodemos en cepas de Brasil. El zimodemo 1 (Z1) es de origen selvático y circula entre animales triatomíneos selváticos y es

infectivo para el hombre; el zimodemo 2 (Z2) es de origen doméstico y comprende cepas aisladas de pacientes con enfermedad de Chagas aguda o crónica y de animales domésticos; el zimodemo 3 (Z3) comprende cepas de casos humanos autóctonos de Brasil y comparte el ciclo selvático, puesto que se ha aislado de armadillos y de algunos casos humanos con la forma aguda de la enfermedad (25-27).

La existencia del Z2 donde participan hospederos selváticos y domiciliarios en el ciclo de transmisión de *T. cruzi*, señala la fuerte posibilidad de que las isoenzimas pueden ser usadas para localizar o rastrear la transferencia de parásitos del ciclo enzoótico al doméstico. También se ha reportado heterogeneidad isoenzimática relacionada con la distribución geográfica de las cepas del parásito. El Z2 se encuentra sobre todo en el centro y el oriente de Brasil donde abundan los triatomíneos domiciliarios y han sido aislado de enfermos crónicos y de animales domésticos (27).

En Venezuela se han encontrado el Z1 y el Z3 con predominio del Z1, en Bolivia el Z1 y el Z2 y en Colombia y Ecuador el Z1 (26-28).

La EF isoenzimática también es útil para estudiar subpoblaciones clonadas de una cepa de *T. cruzi*, las cuales presentan diferencias entre sus patrones isoenzimáticos respecto a la cepa patrón, demostrando que las cepas del parásito pueden ser heterogéneas en su composición.

Bogliolo y col. (1987) demostraron la existencia de patrones isoenzimáticos diferentes según la etapa del ciclo de vida en que se encuentra el parásito, observándose diferencias en el número de bandas, posición e intensidad de las mismas dando lugar a zimodemos diferentes. Estas diferencias obtenidas, según la etapa del ciclo de vida del parásito, pueden ser parte del proceso regulatorio asociado con cambios metabólicos y morfológicos de *T. cruzi* (29).

En 1992 se demostró que las cepas de Brasil que corresponden al Z2 son más susceptibles al tratamiento farmacológico, observándose que los tratamientos previos aumentan la resistencia a las

drogas (30,31).

De manera general, estudios en Brasil en 1992 han detectado diferentes zimodemos en cepas aisladas provenientes de varios hospederos y de diversas zonas geográficas y de manera general las isoenzimas han sido utilizadas como marcadores, lo cual ha permitido seguir el flujo de poblaciones de *T. cruzi* entre los ciclos doméstico y selvático (32).

En estudios realizados en México en pacientes con cardiopatía chagásica crónica, permiten suponer que los parásitos que afectan el corazón pueden tener zimodemos diferentes a los que afectan vísceras huecas y que también hay zimodemos que pueden afectar tanto corazón como vísceras huecas (33).

CARACTERIZACIÓN MOLECULAR.

Además de los métodos bioquímicos existen otros métodos para determinar marcadores genotípicos de *T. cruzi*, como lo es el análisis del DNA del cinetoplasto.

Los minicírculos del DNA del cinetoplasto se utilizan como método taxonómico. El DNA se extrae de los parásitos, se restringe con enzimas de restricción que lo cortan en sitios específicos dando lugar a fragmentos de restricción que se visualizan en geles de poliacrilamida por medio de EF, identificando poblaciones de parásitos llamadas esquizodemos.

Morel y col. (1980) fueron los pioneros en desarrollar la técnica de los esquizodemos, método sencillo y rápido, considerado complemento del método isoenzimático para caracterizar cepas y clonas de *T. cruzi*, aisladas de vectores y por hemocultivo de pacientes con la enfermedad de Chagas (34).

Algunos autores reportan que han detectado inestabilidad en los patrones electroforéticos isoenzimáticos después de pases sucesivos de las cepas por hospederos vertebrados e invertebrados y por medios de cultivo (8,16).

Carneiro y col. (1991) estudiaron cepas provenientes de pacientes chagásicos crónicos de Brasil

que pertenecían a diferentes zimodemos y esquizodemos agrupándolas de acuerdo a su virulencia. Todas las cepas presentaron parasitemia independiente de los zimodemos y esquizodemos a los que pertenecían, confirmando la heterogeneidad encontrada por patrones isoenzimáticos y los de restricción (31).

Se han reportado otros trabajos sobre caracterización molecular de *T. cruzi* donde utilizan los espaciadores no transcritos (ENT) del RNA ribosomal y los fragmentos de restricción de los maxicírculos del DNA de cinetoplasto para formar agrupaciones que filogenéticamente coincidan, estos fragmentos reciben el nombre de kinetodemos (35,36).

Zavala y col. (1992) determinaron que los fragmentos de restricción de los maxicírculos del DNA de cinetoplasto son útiles en la formación de agrupaciones de cepas del parásito y que correlacionan con el árbol filogenético que se forma por la hibridación del DNA total de los parásitos contra la sonda del DNA ribosomal. Lo importante de este método es la estabilidad y conservación que presentan a través del tiempo los kinetodemos obtenidos (35).

En los últimos años se han utilizado técnicas de amplificación del DNA y de la subunidad pequeña del ribosoma (18S) del *T. cruzi*, para caracterización de especie, para estimar la distancia fenotípica entre las cepas, así como, para diagnóstico específico utilizando la prueba de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (37, 38).

COMENTARIO.

El estudio del *T. cruzi* tiene como problema principal la heterogeneidad biológica y molecular del parásito, lo cual crea la necesidad de contar con un método de clasificación que permita la formación de grupos para simplificar el análisis de este parásito, de manera que una cepa pueda ser estudiada como representativa de grupo, ya que los métodos utilizados hasta el momento presentan el inconveniente de la complejidad de las técnicas y la variabilidad de sus resultados.

Caracterización de cepas de *Trypanosoma cruzi*.

El método de los kinetodemos parece contener las ventajas de las técnicas descritas, que junto con la característica de una aparente reproducibilidad de sus resultados y la facilidad de la técnica, lo hacen ser posiblemente el método de elección para la clasificación de las cepas de *T. cruzi*, sin embargo la técnica de amplificación del ADN es más específica para la caracterización interespecífica.

REFERENCIAS.

- 1.- 1987-88: nine programme report of the UNDP/World Bank/WHO Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases (TDR). France: WHO; 1989. p. 89-98.
- 2.- Pinto-Dias JC. Acute Chagas disease. Mem Inst Oswaldo Cruz 1984; 79 (Suppl):85-91.
- 3.- Tropical Disease Research: progress 1975-94: highlights 1993-94: twelfth programme report of the UNDP/World Bank/WHO Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases (TDR). Geneva: WHO; 1995. p. 125-34.
- 4.- UNDP/World Bank/WHO Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases. World Health Assembly Resolution. Ginebre; 1980. p. 27-52.
- 5.- Lammel EL, Muller LA, Isola LD, Gonzalez Cappa SM. Effect of vector on infectivity of *T. cruzi*. Acta Trópica 1985; 42:149-55.
- 6.- Morris SA, Tanowitz H, Hatcher D, Bilezikian JP, Wittnwe M. Alterations in intracellular calcium following infection endothelial cells with *Trypanosoma cruzi*. Mol Biochem Parasitol 1988; 29:213-21.
- 7.- Rangel Aldao R, Allende D, Triana F, Piras R, Enriquez D, Piras M. Possible role of AMP cyclic in the differentiation of *Trypanosoma cruzi*. Mol Biochem Parasitol 1987; 22:39-43.
- 8.- Magalhaes JB, Andrade SG, Sherlock Y. *Trypanosoma cruzi* strains: behavior after passage into autochthonous or foreign species of triatomine (biological and biochemical patterns). Rev Inst Med Trop Sao Paulo 1996; 38:23-8.
- 9.- Tay J, Salazar-Schetino PM, Ontiveros A, Jimenez J. Epidemiología de la enfermedad de Chagas en la población de Oaxaca, Mex. Bol Of Sanit Panam 1979; 87:1-17.
- 10.- Tay J, Lara R, Velazco O, Gutiérrez M. Parasitología Médica 5a. ed. México; Méndez Cervantes; 1991. p. 112-22.
- 11.- Brener Z. Life cycle of *Trypanosoma cruzi*. Rev Inst Med Trop Sao Paulo 1971; 12:171-8.
- 12.- Brener Z. and Chiari E. Variacoes morfologicas observadas em diferentes amostras de *Trypanosoma cruzi*. Rev Inst Med Trop Sao Paulo 1963; 5:220-4.
- 13.- de Souza W. Cell biology of *Trypanosoma cruzi*. Int Rev Cytol 1984; 86:197-282.
- 14.- Petana WB. A revision of *Trypanosoma cruzi* strains from British Honduras and the importance of strains characteristics in experimental chemotherapy of Chagas disease. Trans Roy Sci Trop Med Hyg 1972 ; 66:463-70.
- 15.- Brener Z. Recent development in the field of Chagas disease. Bull WHO 1982; 60:463-73.
- 16.- Brener Z. General review on *Trypanosoma cruzi* classification and taxonomy. Rev Soc Bras Med Trop 1985; 18 (suppl):1-8.
- 17.- Andrade SG. Morphological and behavioural characterization of *Trypanosoma cruzi* strains. Rev Soc Bras Med Trop 1985;18 (suppl):39-46.
- 18.- Dvorak JA.. Host parasite relationships at the cellular level in *Trypanosoma cruzi* infection. Scientific Publication Washington: Panamerican Health Organization; 1977. 347:1-10.
- 19.- Melo RC, Brener Z. Tissue tropism of different *Trypanosoma cruzi* strains. J Parasitol 1978; 64:475-82.
- 20.- Bice DE, Zeledón R. Comparison of infectivity of strains of *Trypanosoma cruzi* J Parasitol 1970; 56:663-70.
- 21.- de Diego JA, Penin P, del Rey J, Mayer R, Gamallo C. A comparative pathological study of three strains of *Trypanosoma cruzi* in an experimental model. Histol Histopath 1991; 6:199-206.
- 22.- Higuchi ML, De Brito T, Martins M, Barbosa A, Bellotti G. Correlation Between *Trypanosoma cruzi* parasitism and myocardial inflammatory infiltrate in human chronic chagasic myocarditis: light microscopy and immunohistochemical findings. Cardiovasc Pathol 1993; 2:101-6.

E del S Guzmán-Marín, JE Zavala-Castro, KY Acosta-Viana, ME. Rosado-Barrera.

- 23.- Postn M, Bailey JJ, Dvorak JA, McDaniel JP, Pottala EW. Studies of *Trypanosoma cruzi* clones in inbred mice. III. Histopathology and electrocardiographical responses to chronic infection. Am J Trop Med Hyg 1987; 37:541-9.
- 24.- Postan M, McDaniel J, Dvorak J. Studies of *Trypanosoma cruzi* clones in inbred mice. II. Course of infection of C57BL/6 mice with single-cell isolated stocks. Am J Trop Med Hyg 1984; 33:235-8.
- 25.- Saravia NG, Hoilguin AF, Cibulskis RE, D'Alessandro A. Divergent isozymes profiles of selvatic and domiciliary *Trypanosoma cruzi* in the Eastern plains, Piedmont and Highlands of Colombia. Am J Trop Med Hyg 1987; 36:59-69.
- 26.- Widner G, Marinkelle CJ, Gulh F, Miles MA. Isozyme profiles of *Trypanosoma cruzi* stocks from Colombia and Ecuador. Ann Trop Med Parasitol 1985; 59:253-7.
- 27.- Miles MA, Cedillos RA, Povia MM, Souza AA, de Prata A, Macedo V. Do radically dissimilar *Trypanosoma cruzi* strains (zymodemes) cause Venezuelan and Brazilian form Chagas' disease. Lancet 1981; 1:1338-40.
- 28.- Tibayrenc M, Miles Ma. A genetic comparison between Brazilian and Bolivian zymodemes of *Trypanosoma cruzi*. Trans Roy Sci Trop Med Hyg 1983; 77:76-83.
- 29.- Bogliolo AR, Godfrey DG. Isoenzyme changes during the life cycle of *Trypanosoma cruzi*. Trans Roy Sci Trop Med Hyg 1987; 81:222-9.
- 30.- Luquetti AD, Miles MA, Rassi A, de Rezende JM, de Souza AA, Povia MM, et al. *Trypanosoma cruzi*: zimodemes associated with acute and chronic Chagas' disease in central Brazil. Trans Roy Sci Trop Med Hyg 1986; 80:462-70.
- 31.- Carneiro M, Romanha AJ, Chiari E. Biological characterization of *Trypanosoma cruzi* strains from different zymodemes and schizodemes. Mem Inst Oswaldo Cruz 1991; 86:387-97.
- 32.- Brener Z, Wendel S, Camargo ME, Rassi A. Chagas disease-American Tripanosomiasis: its impact on transfusion and clinical medical. Brazil 1992. Publ. Cientif. No. 126 (ISBN 917432J236).
- 33.- Mendoza González J, Miranda Lluc E, Velazco Castrejón O, Tinoco Reyna O, Maciel Pérez M. Cardiopatía chagásica crónica. Presentación de 60 casos. Arch Inst Cardiol Mex 1995; 65:546-50.
- 34.- Morel C, Chiari E, Flessman Camargo E, Mattei DM, Romanha AJ, Simpson L. Strains and clones of *Trypanosoma cruzi* can be characterized by pattern of restriction endonuclease products of kinetoplast DNA minicircles. Proc Natl Acad Sci USA 1980; 77:6810-14.
- 35.- Zavala-Castro JE, Velazco-Castrejón O, Hernández R. Molecular characterization of mexican stocks of *Trypanosoma cruzi* using total DNA. Am J Trop Med Hyg 1992; 47:201-9.
- 36.- Dietrich P, Dussan MP, Floeter-Winter LM, Trebilcock MH, Plessman E, Soares MB. Restriction fragment length polymorphisms in the ribosomal gene spacers of *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma cororhini*. Mol Biochem Parasitol 1990; 42:13-20.
- 37.- Fernandes CD, Murta SM, Ceravolo IP, Krug LP, Vigidal PG, Steindel M, et al. Characterization of *Trypanosoma cruzi* strains isolated from chronic chagasic patients, triatomines and opossums naturally infected from the State of Rio Grande so Sul, Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz 1997; 92:343-51.
- 38.- Stothard JR, Frame IA, Carrasco HJ, Miles MA. On the molecular taxonomy of *Trypanosoma cruzi* using riboprinting. Parasitology 1998 ; 117(Pt3) :243-7.