

## **CARACTERIZACIÓN GENÉTICA Y BIOLÓGICA DE UN AISLADO VENEZOLANO DE *TRYPANOSOMA CRUZI*, PROCEDENTE DE UN PACIENTE EN ESTADIO CRÓNICO ASÍNTOMÁTICO (CHAGAS I) DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS EN RATONES ISOGÉNICOS Y NO ISOGÉNICOS (C3H/HE Y NRMI-IMT)**

Anaibeth Nessi <sup>1</sup>, Clara Martínez <sup>2</sup>, Hernán Carrasco <sup>3</sup>,

Lucelia Briceño <sup>4</sup>, Belkisyolé Alarcón de Noya <sup>5</sup>, Marlene Rodríguez <sup>6</sup>

---

**RESUMEN:** *La enfermedad de Chagas representa un problema de salud pública en América Latina. En Venezuela el genotipo asociado a producción de enfermedad cardíaca es el TcI, no obstante, algunos individuos desarrollan síntomas y otros no (Chagas I). Caracterizar genéticamente y biológicamente aislados de Trypanosoma cruzi (T.cruzi) permite comprender las interacciones parásito-huésped. Evaluamos el aislado (X12422), obtenido de un paciente asintomático (Chagas I). La tipificación genética se realizó mediante RAPD (primer A2) y RFLP (Hsp60, GPI). Cepas de ratones: uno de genética controlada (isogénicos C3H/He) y otro no controlada (no isogénicos NMRI-IMT). El aislado resultó ser del genotipo TcI. La infección en ratones C3H/He, se caracterizó por ser sub-patente, mortalidad nula, intensa inflamación del tejido cardíaco y moderada en músculo esquelético, bazo e hígado, ausencia de nidos de amastigotes. Los ratones NMRI-IMT, mostraron período pre-patente de 13 días, mortalidad nula, máxima parasitemia de  $1.59 \times 10^5$  parásitos /ml, el día 40, que disminuyó a los 50 días. Se evidenció inflamación intensa en músculo esquelético, moderada en músculo cardíaco y ausencia en bazo e hígado, observándose nidos de parásitos en músculo esquelético y músculo cardíaco. Se detectó ADN del parásito en todos los tejidos analizados. Mediante LSSP-PCR se demostró la presencia de subpoblaciones y diferencias histotrópicas, en los perfiles de bandas obtenidos en los tejidos seleccionados, demostrando heterogeneidad genética del aislado, diferencias entre sí y entre cada cepa de ratón. Estos hallazgos demuestran, la importancia de los factores genéticos tanto del parásito como del hospedero en un modelo murino de la enfermedad de Chagas (crónico experimental).*

**Palabras clave:** *T.cruzi, TcI, Venezuela, Chagas I asintomático, histotropismo, hospedero, Chagas crónico experimental, C3H/He, Histopatología, Lssp-Pcr*

**CARACTERIZACIÓN GENÉTICA Y BIOLÓGICA DE UN AISLADO VENEZOLANO DE  
TRYPANOSOMA CRUZI, PROCEDENTE DE UN PACIENTE EN ESTADÍO CRÓNICO  
ASÍNTOMÁTICO (CHAGAS I) DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS EN RATONES ISOGÉNICOS  
Y NO ISOGÉNICOS (C3H/HE Y NRMI-IMT)**

**ABSTRACT:** *Chagas disease represents a public health problem in Latin America. In Venezuela, the genotype associated with the production of heart disease is the TcI, however, some individuals develop symptoms and others do not (Chagas I). Genetically and biologically isolated characterization of Trypanosoma cruzi (T.cruzi) allows understanding parasite-host interactions. We evaluated the isolate (X12422), obtained from an asymptomatic patient (Chagas I). Genetic typing was performed using RAPD (primer A2) and RFLP (Hsp60, GPI). Mice strains: one of controlled genetics (isogenic C3H / He) and another uncontrolled (non-isogenic NMRI-IMT). The isolate was found to be of the TcI genotype. The infection in C3H / He mice was characterized by being sub-patent, zero mortality, intense inflammation of the cardiac tissue and moderate skeletal muscle, spleen and liver, absence of amastigote nests. NMRI-IMT mice showed a pre-patent period of 13 days, zero mortality, maximum parasitemia of  $1.59 \times 10^5$  parasites / ml, on day 40, which decreased after 50 days. Intense inflammation in skeletal muscle, moderate in heart muscle and absence in spleen and liver, evidenced by parasites nests in skeletal muscle and heart muscle. Parasite DNA was detected in all tissues analyzed. LSSP-PCR showed the presence of subpopulations and histotropic differences, in the profiles of bands obtained in the selected tissues, demonstrating genetic heterogeneity of the isolate, differences between each other and between each mouse strain. These findings demonstrate the importance of the genetic factors of both the parasite and the host in a murine model of Chagas disease (chronic experimental).*

**Key words:** *T.cruzi, TcI, Venezuela, Chagas I (asymptomatic) histotropism, innkeeper, Chronic experimental Chagas, C3H / He, Histopathology Lssp-Pcr.*

## **INTRODUCCIÓN**

La enfermedad de Chagas, es una afección causada por el protozoo flagelado *T.cruzi* y representa un importante problema de Salud Pública en América del Centro y Sur <sup>1</sup>. Luego de una fase aguda, la cual a veces pasa desapercibida, la enfermedad progresa hacia un período indeterminado asintomático,

con parasitemia indetectable durante el cual aparentemente el sistema inmune garantiza un control no estéril del parásito. Luego de varios años de la infección inicial, una proporción significativa de individuos infectados (20-30%), desarrolla daños cardíacos o digestivos serios, como manifestaciones de la fase crónica de la

enfermedad. Se cree que tal diversidad está asociada a la capacidad de adaptación

1. Profesor Asociado. Dra. en Ciencias de la Salud. Docente de la Cátedra de Parasitología. Jefe del Departamento de Microbiología. Escuela de Bioanálisis. Universidad Central de Venezuela.

2. Profesor Asistente. Licenciado en Biología. Dra. en Ciencias Biológicas. Jefe de la Cátedra de Bioquímica de la Escuela de Nutrición y Dietética. Universidad Central de Venezuela.

3. Profesor Titular. Licenciado en Biología. Dr. en Biología Molecular. Docente de la Cátedra de Bioquímica de la Escuela de Nutrición y Dietética. Jefe del Laboratorio de Biología Molecular de Protozoarios del Instituto de Medicina Tropical "Dr. Félix Pifano". Universidad Central de Venezuela.

4. Profesor Titular. Médico Cirujano. Dra. en Parasitología Médica. Docente de la Cátedra de Parasitología del Instituto de Medicina Tropical "Dr. Félix Pifano". Directora del Instituto de Medicina Tropical "Dr. Félix Pifano". Universidad Central de Venezuela.

5. Licenciado en Biología. Asistente de Investigación del Laboratorio de Biología Molecular de Protozoarios del Instituto de Medicina Tropical "Dr. Félix Pifano". Universidad Central de Venezuela.

6. Técnico de Investigación del Laboratorio de Biología Molecular de Protozoarios del Instituto de Medicina Tropical "Dr. Félix Pifano". Universidad Central de Venezuela.

Recibido: 04-08-19

Aprobado: 10-12-19

y supervivencia del parásito en distintos hospederos <sup>2</sup>.

Diferentes manifestaciones clínicas de la enfermedad en humanos, podrían estar asociadas con cepas específicas o con marcadores genéticos del hospedero, ya que ambos pueden influir en el curso de la infección <sup>3</sup>. A fin de unificar criterios acerca de la heterogeneidad de *T.cruzi* se llegó al consenso de que las cepas de *Trypanosoma cruzi* pueden ser agrupadas en seis unidades discretas de tipificación o DTUs, genéticamente caracterizadas mediante análisis multilocus <sup>4</sup>. En Centroamérica, Colombia y Venezuela se encuentra predominantemente el DTU I o TcI, en humanos, triatominos y reservorios <sup>5</sup>, siendo este genotipo el responsable de la mayoría de los casos de Chagas crónico y agudo reportados <sup>6</sup>. En condiciones naturales, *T.cruzi* puede infectar alrededor de 100 especies de mamíferos de diferentes órdenes, incluyendo animales silvestres y domésticos <sup>7</sup>. El ratón es un excelente modelo experimental para el estudio de la dinámica de la infección con *T.cruzi*, ya que la existencia de diferentes cepas endogámicas de ratón con diferencias en relación a la susceptibilidad a la infección, ha permitido demostrar la existencia del control genético del hospedero <sup>8</sup>. Hasta el

## CARACTERIZACIÓN GENÉTICA Y BIOLÓGICA DE UN AISLADO VENEZOLANO DE *TRYPANOSOMA CRUZI*, PROCEDENTE DE UN PACIENTE EN ESTADÍO CRÓNICO ASÍNTOMÁTICO (CHAGAS I) DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS EN RATONES ISOGÉNICOS Y NO ISOGÉNICOS (C3H/HE Y NRMI-IMT)

momento, considerando al humano y a diversos modelos experimentales, no se conocen con certeza los factores involucrados en la resistencia o susceptibilidad a la infección con este parásito. En el modelo murino experimental de la enfermedad, los ratones sobreviven un largo período de tiempo a la infección con ciertas cepas del parásito, desarrollando lesiones cardíacas y cambios electrocardiográficos similares a los observados en miocarditis humana<sup>9-10</sup>. La patogénesis de la enfermedad de Chagas ha sido atribuida a procesos autoinmunes<sup>11-12</sup>, pero hasta ahora sigue siendo un hecho controversial<sup>13</sup>. Diversos hechos sugieren que independientemente de la contribución del componente autoinmune, la patología se relaciona con la persistencia del parásito en los órganos afectados, donde ellos originan un proceso inflamatorio crónico<sup>14-15</sup>. De acuerdo con esto, el nivel de inflamación se convierte en un reflejo de la carga parasitaria local, lo cual depende de elementos propios del parásito como virulencia, tamaño del inoculo y tropismo<sup>16-17</sup> y por otra parte de factores asociados al hospedero, tales como la respuesta inmune<sup>18-19</sup>. Caracterizar los elementos o factores del hospedero que contribuyen a la producción de lesiones crónicas es de gran importancia en relación al

pronóstico de pacientes crónicos. Con el objeto de conocer si el aislado de *T.cruzi* (X12422), caracterizado genotípicamente como TcI provenientes de paciente con enfermedad de Chagas en estadio crónico (clasificadas clínicamente como Ch I)<sup>6,20</sup> mostraba un comportamiento en el modelo murino similar al del hospedero de donde procede, se empleó un para ello dos cepas de ratones, una de endogamia no controlada (No isogénicos: NRMI-IMT), siendo genéticamente disímiles entre sí como suele ocurrir en los humanos y como control una cepa de ratones de endogamia controlada (Isogénicos:C3H/He) a fin de poder establecer, en la medida de lo posible, si el comportamiento observado en los ratones infectados con dicho aislado de debía a la genética del hospedero o a la genética del parásito.

## MÉTODOS

### Evaluación Clínico- epidemiológica

Se realizó el análisis de la historia clínica del paciente a partir del cual se obtuvo el aislado (X12422) de *T.cruzi*, la cual fue analizada por el Servicio de cardiología experimental y facilitada para su estudio por la

Sección de inmunología del Instituto de Medicina Tropical, con el objeto de conocer el estado clínico del paciente en estadio crónico, lo que permitió clasificarle clínicamente como Chagas I <sup>6,20</sup>.

### **Aislado de *Trypanosoma cruzi* y extracción de ADN**

Se utilizó el aislado X12422, obtenido mediante xenodiagnóstico artificial o indirecto y cultivo de sangre cardíaca de ratones (NMRI-IMT) inoculados con parásitos a partir de heces de triatomíneos (*Rodnius prolixus*) utilizados para el xenodiagnóstico y justo después de la fase inicial de crecimiento en el medio de cultivo una alícuota de cada aislado fue preservada en nitrógeno líquido <sup>5,21-23</sup>.

### **Tipificación molecular de los aislados de *T. cruzi***

La genotipificación del aislado se efectuó mediante amplificación aleatoria de DNA polimórfico (RAPD) <sup>24</sup> y el análisis de fragmentos de restricción RFLP de los genes Hsp60 y Gpl <sup>25</sup>. Los primers empleados se listan en la Tabla 1.

### **RAPD**

La reacción de PCR para RAPD se llevó a cabo usando el Primer A2, bajo las siguientes condiciones: cada reacción de amplificación constó de un volumen final de 20 ul, el cual contenía 10mM de Buffer Tris- HCL (pH8.8) (Invitrogen, Brasil); 2,5 mM MgCl<sub>2</sub> (Invitrogen, Brasil); 0,2mM de cada uno de los

Técnica	Primer	Secuencia	Referencia
RAPD	A2	5'-GAAACGGGTG-3'	(24)
PCR-RFLP	GPI (f)	5'-GGCATGTGAAGCTTTGAGGCCTTTTTTCAG-3'	(25)
	GPI(r)	5'-TGTAAGGGCCCAGTGAGAGCG-3'	(25)
	Hsp60(f)	5'-GTGGTATGGGTGACATGTAC-3'	(25)
	Hsp60 (r)	5'-CGAGCAGCAGAGCGAAACAT-3'	(25)

**Tabla 1.** Primers utilizados y sus secuencias para la tipificación molecular del aislado X12422 de *T. cruzi*

**Fuente:** Elaboración propia

## CARACTERIZACIÓN GENÉTICA Y BIOLÓGICA DE UN AISLADO VENEZOLANO DE *TRYPANOSOMA CRUZI*, PROCEDENTE DE UN PACIENTE EN ESTADÍO CRÓNICO ASÍNTOMÁTICO (CHAGAS I) DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS EN RATONES ISOGÉNICOS Y NO ISOGÉNICOS (C3H/HE Y NRMI-IMT)

dNTPs (Bioline); 20 pg de primer; 1,0 unidad de Taq DNA polimerasa (Invitrogen, Brasil) y 5 ng de

### DNA del genoma del parásito

La reacción se realizó en un termociclador PTC 200 MJ-Research, en las siguientes condiciones: dos ciclos a 95°C por 5min, 30°C por 2 min y 72°C por 1 min; 32 ciclos a 95°C por 1 min, 40°C 30 seg y 72°C por 2 min y una extensión final de 5 min a 72 °C.<sup>24</sup>

### PCR-RFLP

El análisis del polimorfismo de fragmentos de restricción de productos de PCR (PCR-RFLP), fue dirigido a dos Loci: el gen que codifica para la enzima Glucosa fosfato Isomerasa (GPI) y la región intergénica de la proteína de Choque térmico 60 (HsP60), cuyos productos fueron amplificados y digeridos usando las enzimas *HhaI* y *EcoRV* respectivamente <sup>25</sup>. Todos los productos fueron visualizados en geles de agarosa al 2,5% (Invitrogen, USA) y teñidos con bromuro de etidio.

### Comportamiento biológico

#### Ratones, parásitos e infección

Se empleó un total de veintiún (21) ratones machos pesando entre 10-15 grs y de seis

semanas de edad, por cada cepa de ratón, tanto de la cepa no isogénica NMRI\_IMT, suministrada por el Bioterio del Instituto de Medicina Tropical (IMT), como de la cepa isogénica (C3H/He), suministrada por el bioterio del Instituto Venezolano de investigaciones científicas (IVIC). El inóculo fué de aproximadamente 1x10<sup>5</sup> parásitos/gr de peso del ratón vía intraperitoneal con formas tripomastigotas de *T.cruzi*. Se incluyó un grupo control inoculado intraperitonealmente con solución salina estéril. Cada grupo de ratones fue colocado en jaulas. Los animales recibieron agua y comida *ad libitum*.

### Evaluación de la Parasitemia

La evaluación de la parasitemia en los ratones, se realizó en forma interdiaria a partir del tercer día post-infección y seguida de acuerdo con el método de Brener ,1962 <sup>21</sup>. El contaje se realizó en 5 µl de sangre tomado de la punta de la cola del ratón, se contaron 100 campos de 40x y el número de formas tripomastigotas contadas fue multiplicada por un factor que depende el microscopio, del ocular y del objetivo utilizado <sup>21</sup>. Se estableció un promedio de las formas sanguíneas observadas en la sangre de los ratones por día de contaje y se elaboró una curva de

parasitemia. Los criterios para la evaluación de la parasitemia empleados en este estudio fueron: elevada cuando la cantidad de parásitos osciló entre 1500 o más en 5  $\mu$ l, media entre 500 y 1.499 tripomastigotas y baja cuando la cantidad de parásitos fue inferior a 500 tripomastigotas. Con el objeto de estudiar la virulencia y patogenicidad de cada genotipo se evaluaron los siguientes parámetros en cada grupo de ratones: 1) PPP: primer día con muestra de sangre positiva. 2) DP: período con muestra de sangre positiva. 3) NP/5 $\mu$ l de sangre: parasitemia expresada en número de tripomastigotes detectado diariamente en sangre fresca. 4) DMP: día de máxima parasitemia, 5) M: Mortalidad 6) Histopatología: tropismo tisular y características de las lesiones <sup>21,26-28</sup>.

#### **Mortalidad: Tasa de Mortalidad**

Se realizó diariamente, mediante la observación del número de animales que morían durante el curso de la infección, calculando el porcentaje en relación al número total luego de excluir los animales sacrificados. Expresado a través del porcentaje de muertes en la fase aguda y durante la fase crónica <sup>26,29</sup>.

#### **Estudio Histopatológico**

Con el fin de realizar los análisis histopatológicos y moleculares, mediante el siguiente protocolo: Los ratones fueron sangrados y sacrificados por dislocación cervical de acuerdo con las pautas señaladas por el Código de Bioética del FONACIT <sup>30</sup>, durante la fase inicial, aguda y día de máxima parasitemia en el caso de los aislados con parasitemia patente. En el caso de aislados con parasitemias subpatentes, la evaluación se realizó posterior a los 150 días en la fase crónica. Los órganos evaluados histopatológicamente fueron: corazón (Co), músculo esquelético (ME), hígado (H), bazo(Ba), Intestino delgado(Id) e Intestino grueso(Ig) <sup>27-30</sup>. Se tomaron 2 muestras de los siguientes tejidos: corazón, músculo esquelético, intestino delgado intestino grueso , hígado y bazo; una porción del tejido fue fijada en formalina al 10% y se colocaron en un procesador de tejidos marca Shandon Elliot bajo el siguiente esquema de procesamiento: un baño de formalina al 10%, tres baños en alcoholes crecientes (alcohol isopropílico al 70%, 80%, 90%) y dos en alcohol isopropílico al 95%; tres baños de xileno y dos de paraplast (Mc Cormick Scientific Cat. 501006) a 58°C, todos con una duración de cuarenta minutos. Embebido el material en parafina se procedió a su inclusión

**CARACTERIZACIÓN GENÉTICA Y BIOLÓGICA DE UN AISLADO VENEZOLANO DE *TRYPANOSOMA CRUZI*, PROCEDENTE DE UN PACIENTE EN ESTADÍO CRÓNICO ASÍNTOMÁTICO (CHAGAS I) DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS EN RATONES ISOGÉNICOS Y NO ISOGÉNICOS (C3H/HE Y NRMI-IMT)**

con paraplast para hacer los bloques. Se hicieron dos cortes seriados de dos micras de grosor por lámina; a cada espécimen se le realizaron cuatro láminas con las especificaciones anteriores y se tiñeron con Hematoxilina-Eosina (HE). Las mismas fueron examinadas al microscopio.

La evaluación histopatológica, se llevó a cabo observando dos eventos importantes tales como: la inflamación para lo cual se tomó como criterio la presencia de células del sistema inmunológico en las diversas áreas del tejido estudiado, así como la presencia de lesiones fibróticas, que de acuerdo a la intensidad se gradúan en forma semi-cuantitativa (cruces), de tal manera que (-, +, ++, +++): ausente, escasa, moderada y severa respectivamente. Por otra parte, la presencia del parásito mediante la observación de nidos parasitarios o la detección de ADN (por PCR) del parásito en los diferentes tejidos evaluados.

La severidad de la infiltración inflamatoria y el daño tisular fueron expresados arbitrariamente según una escala de uno a tres cruces y considerando: (+) lesiones inflamatorias mínimas; (++) lesiones moderadas; (+++) lesiones severas con gran cantidad de infiltrado mononuclear. El número de células parasitadas (pseudoquistes) fue

calificado de la siguiente manera: (+) presencia de 1-5 células parasitadas; (++) 6-10 pseudoquistes; (+++) más de 10 células parasitadas <sup>21</sup>.

El parasitismo tisular, la virulencia y aspectos de histopatología fueron descritos y registrados fotográficamente con un microscopio Nikon E 200 con cámara Colpix y/o en un microscopio OLIMPUS BXG2.

La segunda porción de los órganos extraídos (corazón, hígado, bazo, músculo esquelético, intestino grueso e intestino delgado), se colocaron en la solución de RNA later, éste último permite preservar los tejidos adecuadamente para someterlos a análisis molecular.

**Aislamiento de ADN de tejidos infectados**

Se tomaron secciones de 5-10 mm de grosor de muestras de corazón, músculo esquelético intestino delgado, hígado y bazo que previamente fueron colocadas en RNA later (Ambion). Luego, cada sección de tejido fue digerida con 500 µL de tampón de digestión (60 mM Tris pH 8.0, 100 mM EDTA y 0.5% SDS) y 10 µL proteínasa k (500 µg/ml) para liberar el ADN y romper la estructura celular, la incubación se efectuó a 55 °C durante toda la noche y con agitación constante <sup>31</sup>.



El ADN de los tejidos digeridos fue extraído con el kit de purificación “Wizard Genomic DNA Purification System (Promega, Madison, WI)”, el cual se basa en la cromatografía de intercambio iónico. Posteriormente su integridad fue confirmada mediante una corrida electroforética en gel de agarosa al 0,8%, teñido con Bromuro de Etidio y visualizado con un equipo de Fotodocumentación Kodak Digital Science con una cámara DC120.

#### **Detección de ADN de *T.cruzi* mediante PCR**

Las secciones de órganos preservados en RNA later (Ambion), fueron analizadas para detectar la presencia de ADN de *T.cruzi* mediante *PCR*. Se amplificó la secuencia de ADN de la región variable del kinetoplasto utilizando los cebadores específicos S35 (3'AAATAATGTACGGGT/G) (GAGATGCATGA5) y S36 (5'GGGTTTCGATTGG GGTGGTGT3')<sup>161-163</sup>. Los tejidos que estaban infectados producían el amplicon de 330 pb de la secuencia diagnóstica para *T.cruzi*.

#### **Condiciones de la PCR**

5µL del ADN purificado a partir de cada tejido fue adicionado a 15µL de una mezcla de reacción para PCR (20 mM Tris HCl pH 8.8, 50mM KCl, 1.5 mM, MgCl<sub>2</sub>, 10mM dNTP's, 10

pmol de cada primer y 1 unidad de Taq DNA Polimerasa). La amplificación se llevó a cabo de acuerdo a las siguientes condiciones de ciclado: Un paso inicial de desnaturalización durante 4 min a 94 °C, seguido por 35 ciclos de 94°C, 55°C y 72°C durante 1min cada uno, correspondientes a la hibridación y extensión de los primers y por último una extensión final durante 10 min a 72°C, como extensión final de los productos amplificados; todo este procedimiento se realizó en un termociclador programable MJ Research PTC200.

Los productos de la PCR con los cebadores específicos fueron sometidos a electroforesis en geles de agarosa a una concentración final de 1,5%(1/3 agarosa de bajo punto de fusión o Low Meltin Point-Agarosa Convencional Invitrogene) para facilitar la visualización y extracción del fragmento de ADN.

Fueron corridos con buffer TBE 1X durante 1 hora a voltaje constante (80 v), luego el gel de agarosa fue teñido con Bromuro de Etidio (2 µl de 50ng/ml BrEt/100 ml de agua destilada) por 10 min y se lavó con agua destilada por 10 min.

## CARACTERIZACIÓN GENÉTICA Y BIOLÓGICA DE UN AISLADO VENEZOLANO DE *TRYPANOSOMA CRUZI*, PROCEDENTE DE UN PACIENTE EN ESTADÍO CRÓNICO ASÍNTOMÁTICO (CHAGAS I) DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS EN RATONES ISOGÉNICOS Y NO ISOGÉNICOS (C3H/HE Y NRMI-IMT)

### **Amplificación de la región variable del minicírculo k-ADN por LSSP-PCR**

Esta técnica se empleó con el objeto de detectar en primer lugar ADN del parásito en los diversos tejidos y posteriormente evaluar la composición poblacional de los mismos debido a que esta técnica permite evaluar el tropismo diferencial de los distintos clones que pueden constituir un aislado de *T.cruzi*. Una vez que se comprobó cuales órganos se encontraban infectados por el parásito se extrajo parte de la banda característica de amplificación correspondiente a 330 pb de cada muestra <sup>32</sup>. Estos fragmentos se fundieron en baño de María y fueron diluidos 10 veces con agua destilada y desionizada (18 Mega OMS, mQ (1/10) posteriormente se tomó una alícuota de 5 µl como molde para la reacción de amplificación por LSSp-PCR <sup>33</sup>.

### **Condiciones de la PCR**

Se realizó la amplificación de la región variable del kinetoplasto ADNk con el iniciador 121 modificado:(5`-AAATAATG TACGGG GGAGA TG-3` ). A 5µl del ADN blanco obtenido de cada tejido se adicionó a 15µL de una mezcla para PCR:(20 mm Tris HCl pH 8.8, 50mm KCl, 1.5 mm MgCl<sub>2</sub>, 10mm dNTP's, 10 pmol de cada primer y 1 unid de Taq DNA Polimerasa).La amplificación se

llevó a cabo de acuerdo a las siguientes condiciones de ciclado: un paso inicial de desnaturalización durante 4 min a 94 °C, seguido por 35 ciclos de 94 °C, 55 °C y 72 °C de 1min cada uno, correspondientes a la desnaturalización, hibridización y extensión y por último una extensión final durante 10 min a 72 °C. Los productos amplificados se analizaron en un gel de poliacrilamida al 6% con el buffer de corrida TBE 1X durante un período de tiempo de 2 horas a voltaje constante (90v). El revelado de las bandas se efectuó con un kit de Tinción de Plata de la casa comercial Biorad siguiendo las instrucciones del fabricante. Tinción de los geles de poliacrilamida con Nitrato de Plata (Kit Biosilver de Biorad).

### **Etapas reactivas tiempo**

Fijación Metanol: Ac. Acético (4:1) 30 min.Oxidación Oxidante 5 min.Lavado Agua Milli-Q (3 lavados) 5 min (c/u).Tinción Reactivo de Plata al 10% 20 min.Lavado Agua Milli-Q 30 seg.Revelado Revelador 5 – 10 min. Solución de parada Ac. Acético al 15% 15 min.

### **Análisis de los patrones de amplificación**

Los fragmentos obtenidos mediante LSSP-PCR fueron analizados directamente sobre los registros fotográficos para determinar la

presencia (1) o ausencia (0) de un fragmento en particular. Se construyó una matriz binaria con el objetivo de evaluar en los fragmentos presentes en los diferentes órganos de los ratones infectados con los tres aislados de *T.cruzi* estudiados.

Para calcular la diversidad genética a partir de los perfiles generados se utilizó el programa POPGENE versión 1.31 para el cálculo del índice de Nei's que permite determinar la distancia genética.

Los dendogramas producidos por este programa fueron dibujados utilizando el programa TreeView Taxonomy and Systematics at Glasgow 1.6.6.

### **Aspectos Bioéticos y administrativos**

Los animales empleados para la experimentación, fueron tratados según las normas establecidas por el Comité de Bioética del Fondo Nacional de Ciencias y Tecnología en su capítulo 2 y Bioética animal en Venezuela <sup>30</sup>, y refrendado por el Comité de Bioética del Instituto de Medicina Tropical de la UCV.

La manipulación de las muestras biológicas utilizadas en este proyecto, contó con el aval del Comité Ético Científico del Instituto de Medicina Tropical de la Universidad Central de Venezuela, quien además hace el seguimiento correspondiente.

Este trabajo de investigación estuvo enmarcado dentro del Proyecto Fonacit de Grupo G-2005000827.

### **Análisis Estadístico**

Se realizó mediante, cálculo de promedios y porcentajes. Los gráficos y análisis estadísticos se construyeron con el software libre "R" Foundation for Statistical Computing program, version 2.9.2 (Copyright 2006, *The R Foundation for Statistical Computing*, ISBN 3-900051-07-0).

## **RESULTADOS**

### **Tipificación Molecular**

Los ensayos de RAPD permitieron identificar el genotipo del aislado X12422, al reproducir el patrón de amplificación de las cepas de referencias con el primer A2 (Figura 1) <sup>27</sup>. Así mismo, la amplificación de los genes GPI y HSP60 y su posterior digestión y con *HhaI* y *EcoRV* respectivamente, generaron fragmentos de 817 y 447 pares de bases característicos de los aislados TcI en el caso de GPI, mientras que para el caso de HSP60 no se obtuvo digestión con la enzima HSP60. De esta manera el aislado X12422, pudo ser identificado como perteneciente al genotipo I de *T.cruzi* (TcI), según los criterios establecidos en la última reunión de expertos

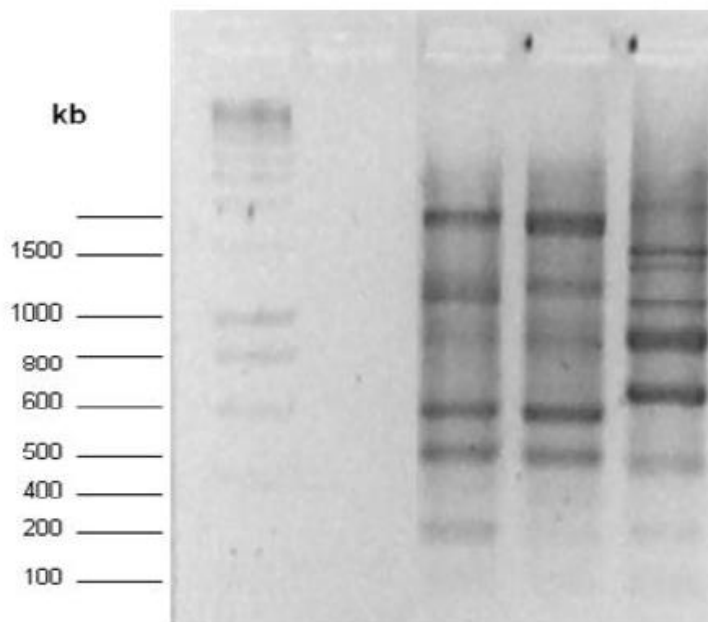
**CARACTERIZACIÓN GENÉTICA Y BIOLÓGICA DE UN AISLADO VENEZOLANO DE *TRYPANOSOMA CRUZI*, PROCEDENTE DE UN PACIENTE EN ESTADÍO CRÓNICO ASÍNTOMÁTICO (CHAGAS I) DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS EN RATONES ISOGÉNICOS Y NO ISOGÉNICOS (C3H/HE Y NRMI-IMT)**

del 2009<sup>28</sup>. En las Figura 2 y 3, se muestra el perfil de fragmentos de DNA amplificados de las cepas de referencia internacional de *Trypanosoma cruzi* TcI, TcIII y TcIV, lo cual permite confirmar el genotipo del aislado.

**Evaluación del comportamiento biológico**

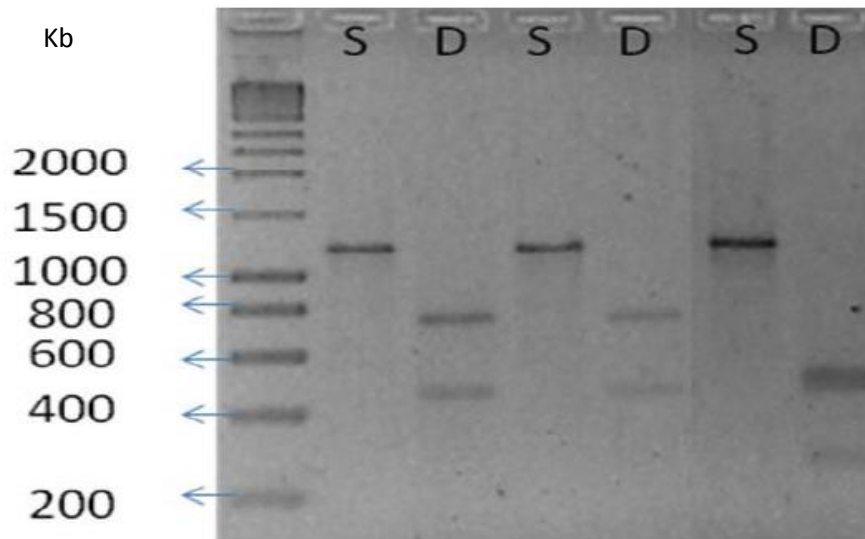
El aislado X12422 de *T. cruzi* inoculado en

ratones NRMI-IMT, mostró un período pre-patente de 13 días. La máxima parasitemia alcanzada fue de  $1.59 \times 10^5$  parásitos /ml observada el día 40, la cual disminuyó alrededor de los 50 días como se muestra en la Figura 4. En la cepa de ratón C3H/He la parasitemia fué subpatente y la mortalidad fue nula en ambas cepas de ratón.



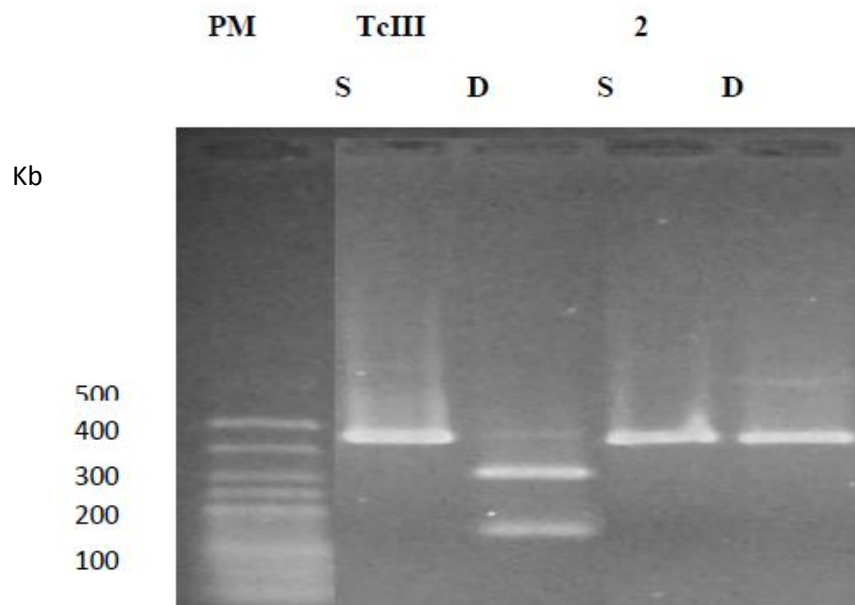
**Figura 1:** Perfiles de aislados de *T. cruzi* (X12422) obtenidos mediante amplificación aleatoria de DNA polimórfico (RAPD) con el primer A2. M=marcador de peso molecula:1Kb ladder. CN:1:X12422; 2:TcI; 3TcIV: Cepas de referencia Internacional.

Fuente: Elaboración propia.



**Figura 2:** Productos de digestión obtenidos con la enzima HhaI para el Gen GPI. Hiperlader I. Aislados: (1)= X12422;(2) y (3)= Cepas de referencia internacional, TcI y TcIV respectivamente. S=Producto sin digerir; D=Producto digerido. Agarosa:2,5%.80V.

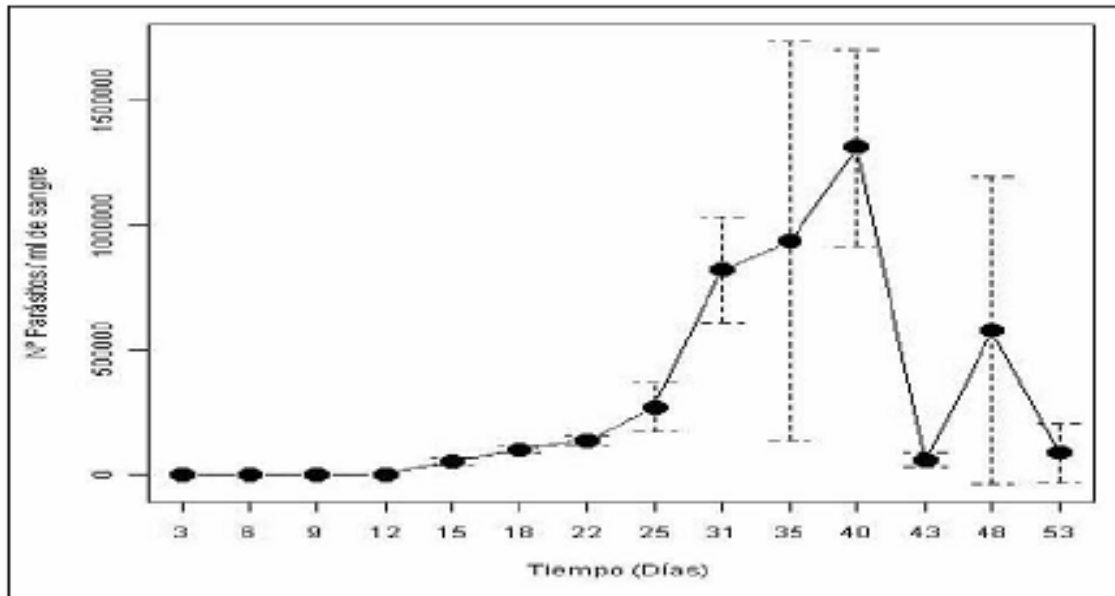
**Fuente:** Elaboración propia



**Figura 3:** Productos de digestión de la region intergénica del gen que codifica para la proteína Hsp60 con la enzima EcoRV Hiperlader V. Aislados: (1)= Cepas de referencia internacional, TcIII; (2)= X12422;(2). S=Producto sin digerir; D=Producto digerido. Agarosa:2,5%.80V.

**Fuente:** Elaboración propia

**CARACTERIZACIÓN GENÉTICA Y BIOLÓGICA DE UN AISLADO VENEZOLANO DE *TRYPANOSOMA CRUZI*, PROCEDENTE DE UN PACIENTE EN ESTADIO CRÓNICO ASÍNTOMÁTICO (CHAGAS I) DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS EN RATONES ISOGÉNICOS Y NO ISOGÉNICOS (C3H/HE Y NRMI-IMT)**



**Figura N°4:** Curva de Parasitemia del aislado X12422 proveniente de humano con enfermedad de Chagas en fase crónica en modelo murino con ratones no isogénicos (NMRI-IMT).

**Fuente:** Elaboración propia

### **Estudio histopatológico**

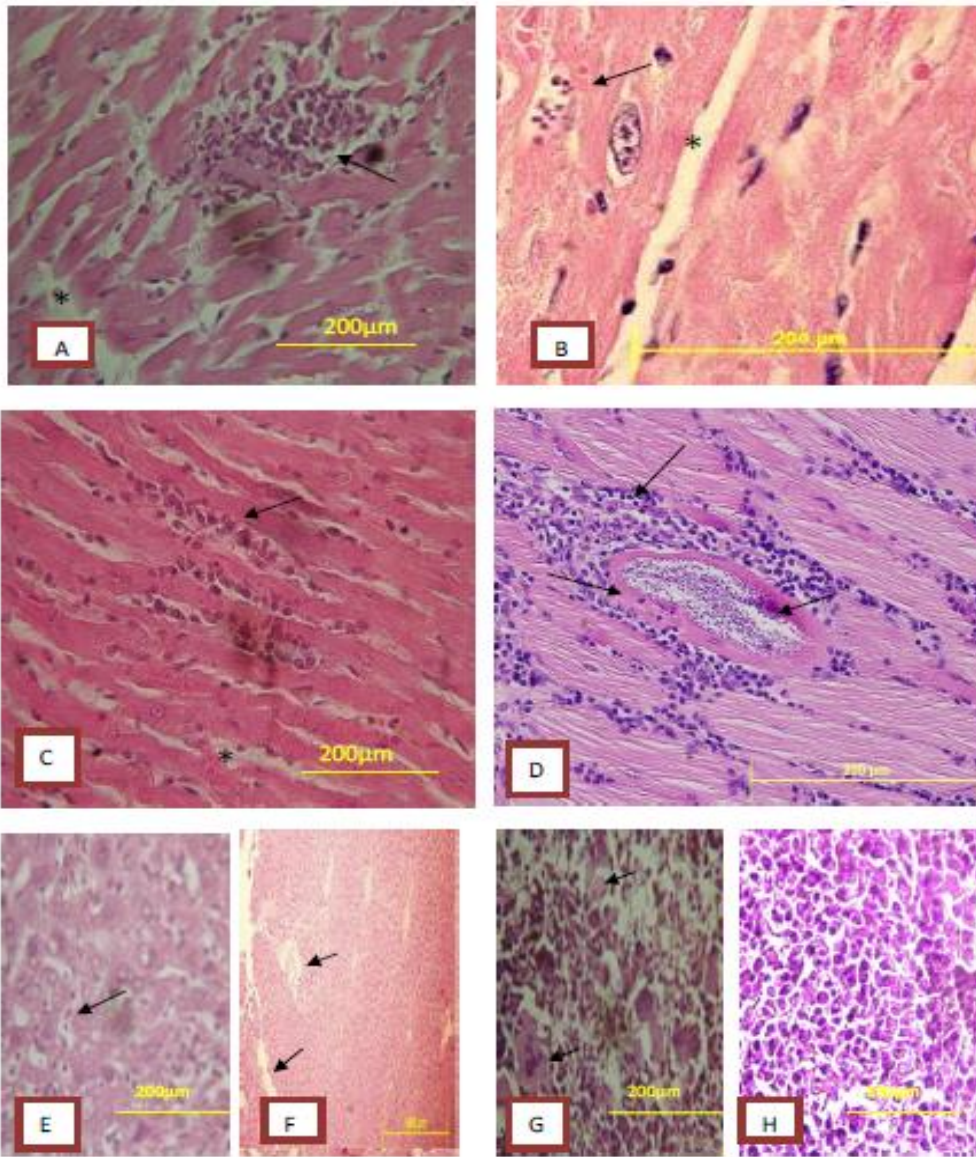
Las secciones obtenidas a partir de corazón, músculo esquelético, bazo e hígado, fueron examinadas con microscopio óptico, observándose inflamación, fibrosis y alteraciones en la arquitectura de los tejidos, en los 4 órganos analizados en la cepa de ratón C3H/He y en 2 de los órganos en los ratones NRMI-IMT. Se observó inflamación más intensa en tejido cardíaco, en los ratones de la cepa C3H/He y en músculo esquelético de los ratones de la cepa NRMI-IMT. Solo fue posible detectar nidos de amastigotes en ratones NRMI-IMT, en músculo esquelético y en músculo cardíaco (Figuras 5 y Tabla 2).

### **Diagnóstico tisular por PCR**

Se pudo evidenciar la paninfectividad de *T. cruzi* al detectar la amplificación del fragmento de 330 pb, que contiene la región variable del DNA del minicirculo del kinetoplasto, en todos los órganos analizados en las dos cepas de ratones (Figura 6 y Tabla2).

### **Caracterización de los parásitos en tejido mediante LSSP-PCR**

Se aprecia que el comportamiento histotrópico de las sub poblaciones que conforman el aislado X12422, fue distinto en las dos cepas de ratones (isogénico: C3H/He y no isogénicos: IMT:NMRI), encontrándose



**Figura 5:** Micrografía de distintos tejidos de ratones infectados con *T. cruzi* y coloreados con H/E. Aislado X12422. A: Musculatura cardíaca (C3H/He), Se observa infiltrados inflamatorios de moderada intensidad (→) con separación de la fibra muscular cardíaca (\*) (Fc). Aumento 400x. B: Musculatura cardíaca (IMT-NMRI) con nido de amastigotes (→) y espacio intercelular (\*). Aumento 1000x. C: Musculatura esquelética (C3H/He) con infiltrado celular escaso, separación de fibra muscular (\*). Aumento 400x. D: Musculatura esquelética (IMT-NMRI) con nido de amastigote, Infiltrado mononuclear intenso y reemplazo por tejido conectivo. Aumento 1000x E y F.: Tejido hepático mostrando signos de alteración celular, así como infiltrados inflamatorios (E: C3H/He y F: IMT-NMR). Aumento 100x. G y H: Tejido esplénico, se observan alteraciones de la arquitectura tisular, así como células nucleadas grandes y de contorno regular similares a megacariocitos (→) (G: C3H/He y H: IMT-NMRI) Aumento 400x. Magnificación 200  $\mu$ m.

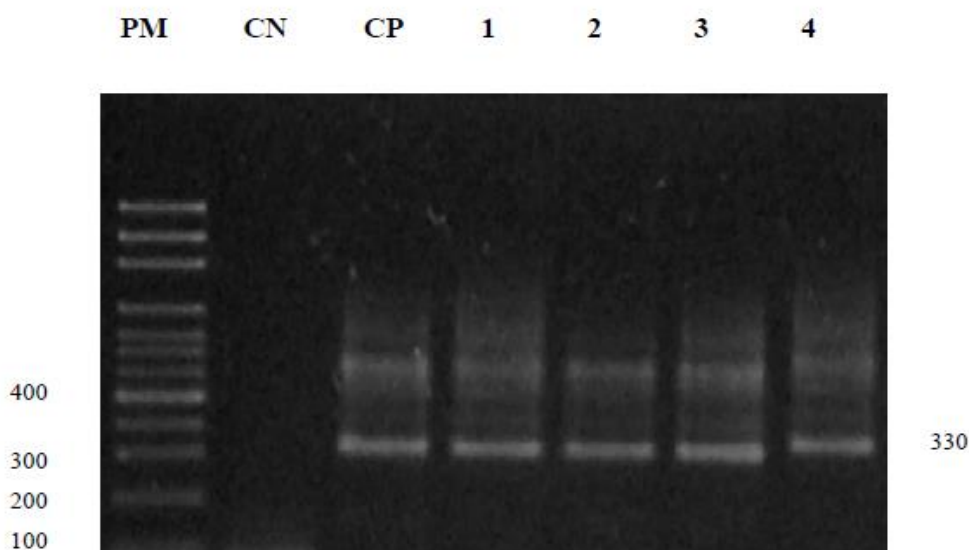
**Fuente:** Elaboración propia

**CARACTERIZACIÓN GENÉTICA Y BIOLÓGICA DE UN AISLADO VENEZOLANO DE *TRYPANOSOMA CRUZI*, PROCEDENTE DE UN PACIENTE EN ESTADÍO CRÓNICO ASÍNTOMÁTICO (CHAGAS I) DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS EN RATONES ISOGÉNICOS Y NO ISOGÉNICOS (C3H/HE Y NRMI-IMT)**

Aislado/cepa de Ratón	Parámetro de Análisis	Corazón	M.esq	Bazo	Higado	Int.Delg	Int.Grue
X12422 IMT: NRMI	Inflamación	++	+++	-	-	-	-
	Nidos	+	+	-	-	-	-
	PCR	+	+	+	+	+	NR
X12422 C3H/He	Inflamación	+++	++	++	++	-	-
	Nidos	-	-	-	-	-	-
	PCR	+	+	+	+	+	NR

**Tabla 2.** Comparación entre el estudio histológico y molecular de tejidos en dos cepas de ratones NRMI-IMT y C3H/He, inoculados con el aislado X12422 de *T.cruzi*.

**Fuente:** Elaboración propia



**Figura 6.** Detección mediante PCR de parásitos en los tejidos de ratones inoculados experimentalmente con el aislado de *T.cruzi* (X12422). PM:marcador de tamaño molecular(100pb Axigen);CN: Control Negativo; CP: cxontrol positivo; Línea 1: Corazón; Línea 2:Hígado;Línea3:Bazo; Línea 4: Músculo esquelético.

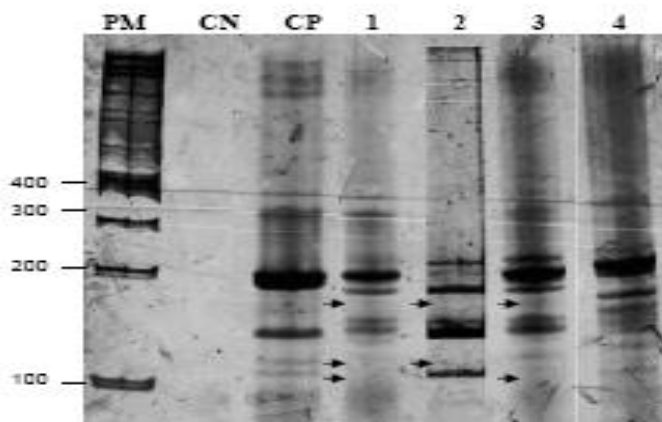
**Fuente:** Elaboración propia



diferencias bien marcadas en los perfiles multibandas generados en el ensayo LSSP-PCR de los tejidos seleccionados. La heterogeneidad genética se evidencia en los patrones observados en corazón, bazo, músculo esquelético e hígado, los cuales son diferentes entre sí y entre cada cepa de ratón como se observa en las Figuras 7-9, donde las flechas reflejan la ausencia de fragmentos en los tejidos. La evaluación mediante la LSSP-PCR mostró un perfil de bandas heterogéneo y diferentes en todos los órganos, lo cual indica una mayor diversidad de genotipos y una complejidad genética.

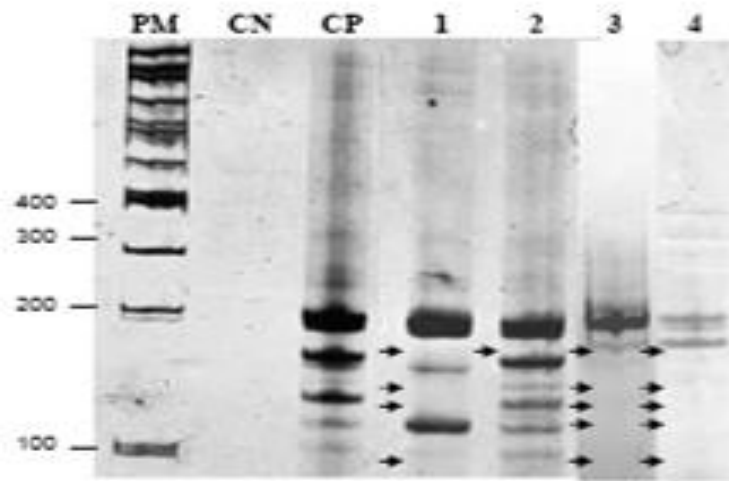
### Análisis de Diversidad Genética

El análisis de Diversidad Genética se utilizó para cuantificar la separación o agrupación de sub-poblaciones presentes en los diferentes tejidos pertenecientes al aislado, reflejado en el dendograma. Se utilizó el programa POPGENE, el cual generó análisis de distancias genéticas basadas en las distancias de Nei's (1978), que permite visualizar la relación entre las sub-poblaciones de parásitos (Figura 10).

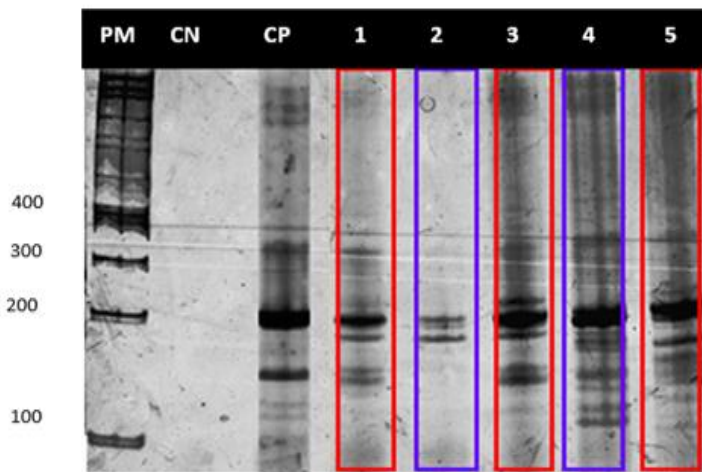


**Figura 7.** Perfil electroforético generado mediante LSSP-PCR de los tejidos provenientes de ratones C3H/He experimentalmente con el aislado X12422. PM: marcador de tamaño molecular (100 pb, Axígen); CN: Control Negativo; CP: Control Positivo, 1: Corazón; 2: Músculo esquelético; 3: Bazo; 4: Hígado.

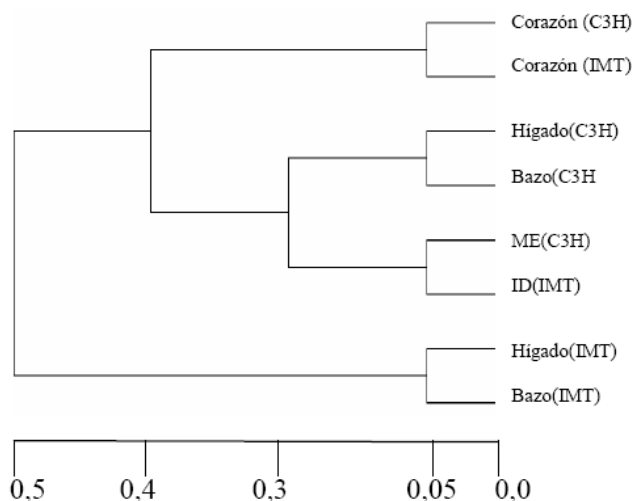
**Fuente:** Elaboración propia



**Figura 8.** Perfil electroforético generado mediante LSSP-PCR de los tejidos provenientes de ratones NMRI: IMT: infectados experimentalmente con el aislado X12422. PM: marcador de tamaño molecular (100 pb, Axígen); CN: Control Negativo, CP: Control Positivo; 1: Int. Delg; 2: Bazo; 3: Hígado; 4: Corazón. **Fuente:** Elaboración propia



**Figura 9.** Gel de poliacrilamida al 6% de los patrones de amplificación del aislado X12422 mediante LSSP-PCR. PM: Marcador de Peso molecular (100 pb), Axígen); CN: Control Negativo; CP: Control Positivo; 1: Corazón (C3H/He); 2: Corazón (NMRI-IMT); 3: Bazo (C3H/He); 4: Bazo (NMRI-IMT); 5: Hígado (C3H/He). **Fuente:** Elaboración propia



**Figura 10.** Dendrograma de agrupamiento por distancia genética de las subpoblaciones presentes en los tejidos provenientes del aislado X12422 inoculado en ratones C3H/He e IMT:NMRI, basado en las distancias genéticas de Nei's.

**Fuente:** Elaboración propia

## DISCUSIÓN

En la segunda reunión de expertos realizada en Buzios Brasil 2009, a fin de unificar criterios acerca de la heterogeneidad de *T. cruzi* se llegó al consenso de que las cepas de *Trypanosoma cruzi*, pueden ser agrupadas en seis unidades discretas de tipificación o DTUs, genéticamente caracterizadas mediante análisis multilocus. En Centroamérica, Colombia y Venezuela se encuentra predominantemente el DTU I o TcI, en humanos, triatomínicos y reservorios.<sup>4-6</sup> En este trabajo se tipificó el aislado X12422,

como perteneciente al DTU I o TcI de acuerdo a la nueva clasificación vigente<sup>4</sup>, siendo este genotipo el responsable de la mayoría de los casos de Chagas crónico y agudo reportados en Venezuela y se demostró, que existe la posibilidad de desarrollar patología 18,6 veces más en la fase crónica de la enfermedad de Chagas, cuando la infección es causada con el genotipo TcI en comparación con en el genotipo TcIV<sup>5,6</sup>. La caracterización biológica de estos aislados y su comportamiento en diferentes modelos murinos aportan información que ayudan a

**CARACTERIZACIÓN GENÉTICA Y BIOLÓGICA DE UN AISLADO VENEZOLANO DE *TRYPANOSOMA CRUZI*, PROCEDENTE DE UN PACIENTE EN ESTADÍO CRÓNICO ASÍNTOMÁTICO (CHAGAS I) DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS EN RATONES ISOGÉNICOS Y NO ISOGÉNICOS (C3H/HE Y NRMI-IMT)**

ampliar nuestros conocimientos para explicar la diversidad de manifestaciones clínicas, severidad y mortalidad de esta enfermedad.

En este estudio trabajamos con un aislado, obtenido de un paciente cuyas características clínicas permitieron clasificarlo como asintomático, y por lo tanto, considerado como Chagas tipo I<sup>20</sup>. Al evaluar el comportamiento biológico de dicho aislado en dos grupos de ratones (genética controlada y no controlada), en ambos se reprodujo lo que se considera el estadio crónico de la enfermedad, observándose diferentes niveles de parasitemia, subpatente en la cepa de ratón C3H/He y la cepa NRMI-IM, se hizo patente a los 13 días post-infección, con un pico de máxima parasitemia a los 40 días pero, no hubo mortalidad durante el periodo de observación en ambas cepas de ratón, por lo cual se considera un aislado poco virulento, que de alguna forma reproduce el comportamiento observado en el individuo a partir del cual se obtuvo. Estos hallazgos coinciden con lo reportado por Marinho *et al* y Rimoldi *et al*<sup>35-37</sup>, los cuales observaron diferencias tanto en susceptibilidad como en mortalidad, al inocular un mismo aislado del parásito en hospederos diferentes; y contrasta con lo reportado por Carrasco *et al* en 2013<sup>6</sup>, con respecto a un aislado TcI, obtenido de un

paciente Venezolano, clasificado clínicamente como Chagas III<sup>20</sup> (el estadio más grave de la enfermedad), el cual mostró un comportamiento de alta virulencia y mortalidad en ratones NMRI, lo que implica que el aislado conserva ciertas características biológicas que son capaces de causar daño importante tanto al hospedero humano como a los ratones a los cuales se les inoculó. Este hecho permite inferir, que existen condiciones intrínsecas del parásito perteneciente al mismo genotipo (TcI), que independientemente de las condiciones del hospedero, definen la posibilidad que pueda producirse o no daño en el individuo infectado. En este caso particular, podríamos asumir, que la condición genética del parásito prevalece sobre la del hospedero. Consideramos estos resultados muy importantes, debido a que se han hecho reportes en la literatura de modelos de Chagas experimental, con aislados de alta virulencia y del genotipo TcII, procedentes de triatomíneos, reservorios y humanos, y pocos con TcI, lo cual no permite hacer inferencias en relación al desarrollo de la enfermedad, en países donde el predominio de los aislados circulantes es TcI, y que en particular, se pueda trabajar con un aislado de baja

virulencia, que permita la evolución en forma crónica de la enfermedad <sup>34</sup>.

Un hallazgo relevante es que las dos cepas de ratones crónicamente infectados con el aislado de *T.cruzi* X12422, muestran lesiones inflamatorias en diferentes órganos, siendo en la cepa C3H/He moderada en todos los órganos excepto en músculo cardíaco, en la cual la inflamación es intensa. A diferencia de lo que ocurre en los ratones NRMI-IMT, en los cuales solo se observan procesos inflamatorios en músculo cardíaco y esquelético siendo más intenso en este último. Estos resultados coinciden con lo reportado por Marinho *et al* <sup>35</sup>, en relación a la diferencia demostrada en los órganos blanco, en los cuales el parásito induce patologías.

El análisis histopatológico también reveló la ausencia de nidos de amastigotes, en el caso de la cepa C3H/He, en los tejidos evaluados, contrario a lo observado en la cepa NRMI-IMT, en la cual se observa la presencia de nidos de amastigotes en músculo esquelético en cantidad moderada y escasos en músculo cardíaco. Por otra parte, también se pudo demostrar la presencia de ADN del parásito en todos los tejidos evaluados en ambas cepas de ratones mediante PCR, lo cual confirma lo observado por Andrade *et al* <sup>9</sup>, en relación a la dificultad de observación de nidos de amastigote en la fase crónica en los

tejidos de los animales infectados, lo cual también concuerda con lo señalado por Añez *et al* <sup>15</sup>, donde evidenció la persistencia de parásitos en biopsias miocárdicas de pacientes crónicos, que aunque escasos, pueden causar daños en el transcurso del tiempo parecidos a los producidos en la fase aguda de la enfermedad <sup>12</sup>. En el caso de los tejidos donde no se pudo observar la presencia directa del parásito mediante análisis microscópico, pero que resultaron positivos por PCR, sería recomendable realizar técnicas que nos permitan detectar la viabilidad del parásito, tales como cultivo de los órganos, así como técnicas de inmunohistoquímica, lo cual permitiría corroborar que la persistencia del parásito es la causa principal de los daños tisulares asociados a la enfermedad de Chagas <sup>38</sup>.

Se han reportado casos de individuos aparentemente asintomáticos, que han muerto por otras causas distintas a la enfermedad y el análisis post-mortem ha revelado la presencia de miocarditis focal discreta <sup>10</sup>, en la cual el parásito es raramente encontrado. No obstante, el hecho de detectar la presencia de DNA mediante técnicas moleculares, ha contribuido a entender que las lesiones focales encontradas en la musculatura cardíaca y otros órganos durante la fase indeterminada, son parásito-

**CARACTERIZACIÓN GENÉTICA Y BIOLÓGICA DE UN AISLADO VENEZOLANO DE *TRYPANOSOMA CRUZI*, PROCEDENTE DE UN PACIENTE EN ESTADÍO CRÓNICO ASÍNTOMÁTICO (CHAGAS I) DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS EN RATONES ISOGÉNICOS Y NO ISOGÉNICOS (C3H/HE Y NRMI-IMT)**

dependiente <sup>39-40</sup>.

En relación a las diferencias observadas de comportamiento biológico y hallazgos histopatológicos en los dos grupos de ratones evaluados, el uso de la técnica LSSP-PCR permitió evidenciar en el aislado (X12422) la existencia de subpoblaciones, mostrando una constitución heterogénea así como tropismo diferencial entre los tejidos analizados en cada cepa de ratón, y entre ambas, encontrándose la existencia de un patrón multibandas distinto y a su vez se observó diferencias entre los perfiles de amplificación entre los mismos órganos que provenían de ratones C3H/He y de ratones NRMI-IMT, demostrando la variabilidad genética que presenta la cepa X12422, a lo cual podría atribuirse algunas diferencias de comportamiento intra e inter-hospedero observadas. Finalmente, se puede decir que la utilización de la técnica molecular LSSP-PCR es una valiosa herramienta en los estudios epidemiológicos de infecciones tanto humanas como experimentales porque demuestra el tropismo diferencial del parásito, la variabilidad genética encontrada en ellos y a su vez en algunos casos podría permitir la correlación de las lesiones encontradas en los tejidos con su presencia en los mismos.

Hasta el momento no está claro, cuál es el elemento que determina la variación de las manifestaciones, el parásito, el hospedero o la interacción entre ellos. *T. cruzi*, está constituido por sub-poblaciones que muestran una gran heterogeneidad <sup>41</sup>, así que aunque el aislado X12422 pertenece al genotipo TcI, no podemos obviar que no es un clon y que por ende, está constituido por diferentes subpoblaciones que presentan histotropismo diferencial <sup>42</sup>.

## **CONCLUSIONES**

Los resultados obtenidos en este estudio, permiten en primer lugar, evidenciar la importancia de la interacción parásito-hospedero, ya que aún cuando el aislado X12422 se caracteriza por ser de baja virulencia, las manifestaciones histopatológicas observadas variaron al utilizar una cepa de ratón diferente, aunado al hecho de haberse determinado que es un aislado genéticamente heterogéneo, ratifica la importancia de la constitución genética tanto del parásito como del hospedero en la evolución de la enfermedad de Chagas. Lo cual permite inferir que posiblemente muchos pacientes con enfermedad de Chagas crónico, son el resultado de infecciones con parásitos de baja virulencia tal como el aislado

X12422. Por otra parte, este estudio permitió el desarrollo de un modelo murino de la enfermedad de Chagas crónico, con un aislado tipificado genéticamente como TcI, lo cual constituye un aporte que permitirá en un futuro evaluar diversos parámetros bioquímicos y de expresión génica que contribuyan a esclarecer los factores determinantes en el desarrollo del Chagas crónico en países donde predomina este genotipo en humanos.

## REFERENCIAS

1. World Health Organization. Chagas Disease (American Trypanosomiasis). WHO [Internet]. 2017 [Citado 21 febrero 2017]. Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/>.
2. Zingales B, Pereira MFS, Oliveira RP, Almeida KA, Umezawua ES, Souto RP, et al. *Trypanosoma cruzi* genome Project: biological characteristics and molecular typing of Clone CL Brenner. *Acta Trop.* 1997; 68:159-173.
3. Sturm NR, Vargas NS, Westenberger SJ, Zingales B, Campbell DA. Evidence for multiple hybrid groups in *Trypanosoma cruzi*. *Int J Parasitol.* 2003; 33:269-279.
4. Zingales B, Andrade SG, Briones MRS, Campbell DA, Chari E, Fernandes O, Guhl F, Lages-Silva E, Macedo AM, Machado CR, Miles MA, Romanha AJ, Sturm NR, Tibayrenc M, Schijman AG. A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: Second revision meeting recommends TcI to TcVI. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2009; 104:1051-1054.
5. Carrasco HJ, Segovia M, Llewellyn MS, Morocoima A, Urdaneta-Morales S, Martínez C, Martínez CE, García C, Rodríguez M, Espinosa R, de Noya BA, Díaz-Bello Z, Herrera L, Fitzpatrick S, Yeo M, Miles MA, Feliciangeli MD. Geographical Distribution of *Trypanosoma cruzi* Genotypes in Venezuela. *PLoS Negl Trop Dis.* 2012; 6 (6): e1707.
6. Carrasco HJ, Nessi AJ, Londoño JC, Rodríguez AE, Moleiro F, Mendoza L. Molecular Epidemiology of Chagas Disease in Venezuela. *SOJ. Microbiol. Infect. Dis.* 2013; 1(1): 6. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.15226/sojmid.2013.00101>
7. Teixeira A, Sadi J, Rebelo E, Algañaraz D, Vieira L, Laura-Pires R, Nascimento C, Vexenat A, Silva S, Ault J. Emerging Chagas Disease: Trophic network and cycle of transmission of *Trypanosoma cruzi* from palm trees in Amazon. *Emer. Infect. Dis.* 2001; 1:100-112.
8. Hoft DF; Ynch R, Kirchoff L. Kinetics analysis of antigen-specific immune response in resistant and susceptible mice during infection with *Trypanosoma cruzi*. *J. Immunol.* 1993; 151:7038-7047.
9. Andrade SG, Andrade ZA. Pathology of prolonged experimental Chagas disease. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo.* 1968; 1:180-187.
10. Pifano F, Domínguez A, Romero J. Morfogenesis de las lesiones tempranas

**CARACTERIZACIÓN GENÉTICA Y BIOLÓGICA DE UN AISLADO VENEZOLANO DE *TRYPANOSOMA CRUZI*, PROCEDENTE DE UN PACIENTE EN ESTADÍO CRÓNICO ASÍNTOMÁTICO (CHAGAS I) DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS EN RATONES ISOGÉNICOS Y NO ISOGÉNICOS (C3H/HE Y NRMI-IMT)**

producidas por el *Schizotrypanum cruzi* en condiciones experimentales y su correlación con la infección humana. Arch. Ven. Med. Trop. 1965; 5:95-121.

11. Cunha-Neto E, Coelho V, Guilherme L, Fiorelli A, Stolf N, Kalil J. Autoimmunity in Chagas disease. Identification of cardiac myosin-B13 *Trypanosoma cruzi* protein crossreactive T Cell clones in heart lesions of a chronic Chagas cardiomyopathy patient. J.clin. Investig.1996; 98:1709-1712.

12.Engman DM, Leon JS. Pathogenesis Chagas disease: rol of autoimmunity. Acta Trop. 2002; 81:123-132.

13.Tarleton RI. Parasite persistence in the aetiology of Chagas disease. Int. J. Parasitol. 2001; 31: 550-554.

14. Vago AR, Macedo AM, Adad SJ, Reis DD, Correa OR. PCR detection of *Trypanosoma cruzi* DNA in oesophageal tissues of patients with chronic digestive Chagas disease. Lancet.1996; 384:891-892.

15.-Añez N, Carrasco H, Parada H, Grisante A, Rojas C, Fuenmayor N, González G, et al . Myocardial parasite persistence in chronic chagasic patients. Am. J. Trop. Med. Hyg. 1999; 60:726-732.

16.- Marinho CR, D'Imperio Lima RD, Grisotto MG, Alvarez JM. Influence of acute-phase parasitic load on pathology, parasitism and activation of the immune system at the late chronic phase of Chagas disease. Infect. Inmun.1999; 67:308-318.

17. Vera-Cruz JM, Magallon-Castelon G, Grijalva A, Rincon R, Ramos-García C, Armendia J. Molecular diagnosis of Chagas´disease and use of animal model to study parasite tropism. Parasitol. Res. 2003; 89: 480-486.

18- Trishmann TM, Bloom BR. Genetics of murine resistance to *Trypanosoma cruzi*. Infect. Immun.1982; 35: 546-551.

19. Zhang L, Tarleton RL. Parasitic persistence correlates with disease severity and localization in chronic Chagas disease. J.Infect.Dis.1999; 180:480 -486.

20. García R, Hernández E, Rodríguez C, Jimenez M, Bonfante R, Añez N, et al. Primer consenso venezolano sobre la enfermedad de Chagas: Conclusiones y recomendaciones. Avanc Cardiol. 2001; 21: 14-23.

21. Brener Z. Therapeutic activity and criterion of cure on mice experimental infected with *Trypanosoma cruzi*. Rev Inst Med Trop Sao Paulo.1962; 4:389-396.

22. Maecklet,G. A modified procedure of xenodiagnostic for Chagas disease. Am J Trop Med Hyg.1964:11-15.

23. Miles MA. Culturing and biological cloning of *Trypanosoma cruzi* Methods. Mol. Biol.1993; 21:15-28.

24.-Carrasco H, Frame I, Valente S, Miles M. Genetic exchange as a possible source of genomic diversity in silvatic populations of *Trypanosoma cruzi*. Am J Trop Med Hyg. 1996; 54: 418-424.



25. Westenberger SJ, Bernabé C, Campbell DA, Sturmm NR, et al. Two hybridization events define the population structure of *Trypanosoma cruzi*. *Gen Soc Am.* 2005; 171:527-543.
- 26.-Carneiro M, Romanha A, Chiari E. Biological characterization of *Trypanosoma cruzi* strains from different zymodemes and schizodemes. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1991; 86: 387-97.
27. Devera R, Illaramendi X, Montoya-Araujo R, Primez C, Fernández O, Coura R. Biodemas de cepas do *Trypanosoma cruzi* isoladas de humanos de tres áreas endémicas de Minas Gerais. *Rev Soc Bras. Med Trop.* 2002; 35(4):323-330.
28. Toledo M, de Lana M, Carneiro M, Bahia M. Impact of *Trypanosoma cruzi* clonal evolution on its biological properties in mice. *Exp.Parasitol.* 2002; 100: 161-172.
29. Andrade SG, C caracterização de cepas do *Trypanosoma cruzi* isoladas no reconcavo Baiano (Contribución ao estudo da patologia general da doneça de Chagas em nosso meio) *Rev.Pat.Trop.*1974;(3)1,65-12.
30. Comisión de Ética, Bioética y Bioseguridad del Fondo Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación (FONACIT). Normas de bioética y bioseguridad. Ministerio del Poder Popular para la Ciencia y la Tecnología [Internet]. 2008 [Citado 21 febrero 2017]. Disponible en: [www.ciens.ucv.ve › sites › biolanimlab › archivos › codigo\\_fonacit\\_2008](http://www.ciens.ucv.ve/sites/biolanimlab/archivos/codigo_fonacit_2008)
31. Wright D, Manos M. Sample preparation from paraffin-embedded tissues. In: Innis, M.A., White, T.J. (Eds.), *A Guide to Methods and Applications: PCR Protocols*. New York: Academic Press;1990.
32. Pena SDJ, Barreto G, Vago AR, De Marco LA, ReinachFC, Dias Neto E, Simpson AJG. Sequence-specific 'genesignatures' can be obtained by PCR with single specific primers at low stringency. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91:1946–1949.
33. Vago AR, Andrade LO, Leite AA, Dávila D,Macedo MA, Adad SJ, Tostes S, Moreira MC, Pena DS. . Genetic Characterization of *Trypanosoma cruzi* directly tissues of patients with chronic Chagas disease: differential distributions of genetic type into diverse organs. *Am J Pathol.* 2000; 156:1805-1809.
34. Espinoza B, Rico T, Sosa S, Oxaca E, Vizcaino-Castillo A, Caballero ML, Martinez I. Mexican *Trypanosoma cruzi* *T.cruzi* I strains with different degrees of virulence induce diverse humoral and cellular immune responses in a murine experimental infection model. *J Biomed Biotech;* 2010. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1155/2010/890672>
- 35.- Marinho C, Bucci D, Dagli M, Bastos K, Grisette M, Sardinha L, Baptista C, Pena C, D'Imperio MR, Alvarez J. Pathology affects different organs in two mouse strains chronically infected by a *Trypanosoma cruzi* clone: a model for genetics studies of chagas disease. *Infect. Immun.* 2004;2350-2357.
36. Rimoldi A, Tomé A R, Luz AD, Tita F MZ, et a. Morphological, biological and molecular characterization of three strains of *Trypanosoma cruzi* Chagas, 1909 (Kinetoplastida, Tripanosomatidae) isolates from *Triatoma sordid*

**CARACTERIZACIÓN GENÉTICA Y BIOLÓGICA DE UN AISLADO VENEZOLANO DE *TRYPANOSOMA CRUZI*, PROCEDENTE DE UN PACIENTE EN ESTADÍO CRÓNICO ASÍNTOMÁTICO (CHAGAS I) DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS EN RATONES ISOGÉNICOS Y NO ISOGÉNICOS (C3H/HE Y NRMI-IMT)**

(Stal) 1859 (Hemiptera, Reduviidae) and domestic cat. *Parasitol.* 2012;139 (1):37-44.

37. Rimoldi A, Lima L, Aguiar de Almeida L, Monteiro J, Gonçalves C J, Dameli N J, Freitas de Araujo R, Mello F. Biological and Molecular Characterization of *Trypanosoma cruzi* Strains from Four States of Brazil. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2018; 98 (2):453–463.

38. Guarner J, Barrett J, Zakis S, Colley D, Grijalva M, Powell M. Mouse Model for Chagas disease: immunohistochemical distributions of different stages of *Trypanosoma cruzi* in tissues through infections. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2001; 65 (2): 152 -158.

39. Jones EM, Colley DG, Tostes S, Reis L E, Venecak-Jones CL, Mc Curley TL. Amplification of *Trypanosoma cruzi* DNA sequence from inflammatory lesions in human chagasic cardiomyopathy. *Am. J. Trop. Med Hyg.* 1993; 48:384-357.

40. Higuchi ML, Gutierrez PS, Daiello V, Palomino S E, Bocchi JK, Belloti G, et al. Immunohistochemical characterization of infiltrating cells in human chronic chagasic myocarditis: comparison with myocardial rejection process. *Virchows Arch A Pathol Anat Histocompathol.* 1993; 432: 157-160.

41. Tibayrenc M, Ayala FJ. The clonal theory of parasitic protozoa: 12 years on. *Trends Parasitol.* 2002; 18: 405-410.

42. Macedo A, Pena S. Genetic variability of *Trypanosoma cruzi*: implications for the

pathogenesis of Chagas disease. *Parasitol Today.* 1998; 14:119-123.

**CORRESPONDENCIA:** Anaibeth Nessi. Dirección: Laboratorio de Amibiasis. Cátedra de Parasitología. Escuela de Bioanálisis. Facultad de Medicina. Universidad Central de Venezuela. Teléfono: (0424) 1490260. Dirección de correo electrónico: anaibethnessi@gmail.com