



**UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE BIOLOGÍA**

**EVALUACIÓN INMUNOPARASITOLÓGICA DE AISLADOS
VENEZOLANOS DE *Trypanosoma cruzi* PROVENIENTES DEL CICLO
PERIDOMÉSTICO DE ZONAS URBANAS DEL DISTRITO CAPITAL,
EN EL MODELO MURINO DELA ENFERMEDAD DE CHAGAS**

TRABAJO ESPECIAL DE GRADO

Presentado ante la ilustre
Universidad Central de Venezuela por la:
Br. Lurian's A. Díaz Centeno
como requisito para optar al título de
Licenciado en Biología.

Tutora: Dra. Cristina Sanoja W.

CARACAS, MAYO DEL 2014

A mi abuela y a mi madre

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la Universidad Central de Venezuela, por permitirme llevar a cabo mis estudios de pregrado.

Especiales agradecimientos a la Dra. Cristina Sanoja, por darme la oportunidad de realizar este trabajo en su laboratorio, por transmitirme sus conocimientos y experiencias, quiero agradecerle por su paciencia, su confianza, y su compromiso.

Debo agradecer sin duda al Dr. Gilberto Payares, por su valioso aporte en conocimiento y apoyo en la realización de este trabajo.

Mi agradecimiento a la Dra. Palmira Guevara, por permitirme llevar a cabo los análisis moleculares en el Laboratorio de Genética Molecular, por enseñarme técnicas de Biología Molecular y brindarme su apoyo.

A la Dra. M^a. Lorena Márquez, del Laboratorio de Cultivo de Tejidos y Biología de Tumores, por brindarme el conocimiento y las herramientas para realizar la evaluación histológica, además de sus amables consejos en todo momento.

Muy agradecida con la Dra. Zoraida Díaz-Bello, de la sección de Inmunología del Instituto de Medicina Tropical, por ayudarme a realizar los ensayos inmunológicos fundamentales para realización de este trabajo, de igual forma transmitirme experiencias, conocimientos y consejos.

Al Dr. Juan Carlos Jiménez, del Instituto de Inmunología de la UCV, por facilitar la obtención de reveladores para los ensayos de ELISA, material indispensable para la realización de este trabajo.

Al Dr. Matías Reyes-Lugo, de la sección de Entomología del Instituto de Medicina Tropical, quien amablemente nos cedió triatominos para el mantenimiento de los aislados de *T. cruzi*.

A la Sra. Dora Rojas de García del Bioterio del Instituto de Biología Experimental

A Joel Gutiérrez, por tu apoyo, tu ayuda ante cualquier situación, por ser mi amigo y compañero incondicional durante muchos años, mi eterno agradecimiento. A mis compañeros y amigos más cercanos por el apoyo.

Gracias mi abuela Flor Sojo de Centeno y a mi madre Ytrian Centeno por todo.

¡Gracias!

ÍNDICE

RESUMEN.....	i
1.INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. La Enfermedad de Chagas.....	1
1.2. <i>Trypanosoma cruzi</i> : el agente etiológico. Ciclo de vida.	2
1.2.1. Ciclos epidemiológicos de <i>Trypanosoma cruzi</i>	4
1.3. Mecanismos de transmisión de la Enfermedad de Chagas.....	6
1.4. Fases de la enfermedad de Chagas.	8
1.5. Diversidad genética de <i>T. cruzi</i> y su relación con las diferentes formas clínicas de la ECh.11	
1.6. Respuesta inmunológica durante la infección por <i>T. cruzi</i>	12
1.7. Métodos para el diagnóstico parasitológico, inmunológico y molecular de la enfermedad de Chagas.....	13
2.ANTECEDENTES	15
3.OBJETIVOS	22
3.1. Objetivo General.	22
3.2. Objetivos específicos.	22
4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	23
4.1. Material biológico.	23
4.2. Caracterización genética de los aislados de <i>Trypanosoma</i> sp. YAGUA Y MACH-1.	23
4.2.1. Obtención de las muestras.	23
4.2.2. Aislamiento del ADN total.	24
4.2.3. Caracterización del taxón especie (<i>Trypanosoma cruzi</i>).	24
4.3. Uso de tripomastigotes aislados de la cavidad peritoneal de ratones para la preparación del inóculo de parásitos.	27
4.4. Influencia del aislado de <i>T. cruzi</i> y la vía de infección sobre la respuesta parasitológica e inmunológica en ratones NMRI.	28
4.4.1. Vía de infección intraperitoneal.....	29
4.4.2. Vía de infección oral.....	29
4.5. Evaluación parasitológica de ratones infectados con los aislados durante la fase aguda de la infección.	29
4.5.1. Evolución de la parasitemia.....	30
4.5.2. Cuantificación de tripomastigotes en la cavidad peritoneal.	30
4.5.3. Detección de tripomastigotes sanguíneos por el método del hematocrito.....	31

4.6. Evaluación del tropismo cardíaco del aislado de <i>T. cruzi</i> YAGUA mediante métodos histológicos.....	32
4.7. Respuesta inmunológica de anticuerpos IgM e IgG contra <i>T. cruzi</i> durante la fase aguda experimental.	33
4.7.1. Obtención de sueros sanguíneos.	33
4.7.2. Evaluación de anticuerpos IgM e IgG anti- <i>T. cruzi</i> mediante el Ensayo de Inmunoabsorción Ligado a Enzimas.	34
4.8. Evaluación del efecto de inóculos más elevados administrados por vía oral.....	35
4.9. Análisis estadístico.....	36
5.RESULTADOS.....	37
5.1. Diagnóstico molecular de tripanosomatideosprovenientes de <i>Didelphis marsupialis</i> (aislado YAGUA) y <i>Panstrongylus</i> sp. (aislado MACH-1) en el taxón especie <i>Trypanosoma cruzi</i>	37
5.2. Efectividad del empleo de tripomastigotes procedentes de la cavidad peritoneal de ratones experimentales.....	38
5.3. Evaluación parasitológica de ratones infectados por vía intraperitoneal con un inóculo de $2,5 \times 10^3$ parásitos de <i>T. cruzi</i> de los aislados YAGUA y MACH-1.....	38
5.3.1. Evolución de la sobrevivencia y parasitemia de los ratones experimentales.	39
5.3.2. Estudio de la cinética de tripomastigotes en la cavidad peritoneal de los ratones experimentales.....	40
5.4. Estudio microscópico del exudado de la cavidad peritoneal de los ratones infectados. Morfología de los tripomastigotes intraperitoneales.	43
5.5. Evaluación de la infectividad de tripomastigotes intraperitoneales administrados por vía oral en el modelo murino.....	45
5.5.1. Evaluación parasitológica de ratones infectados por vía oral con un inóculo de $2,5 \times 10^3$ parásitos de <i>T. cruzi</i> de los aislados YAGUA y MACH-1.....	46
5.5.2. Evaluación parasitológica de ratones infectados por vía oral empleando inóculos más elevados de ambos aislados de <i>T. cruzi</i>	46
5.5.3. Variación de la respuesta parasitológica tras un incremento exponencial del inoculo de <i>T. cruzi</i> aislado MACH-1 en la infección oral.....	51
5.6. Estudio del cardiotropismo del aislado <i>T. cruzi</i> YAGUA.....	54
5.7. Diagnóstico molecular de la infección chagásica experimental mediante PCR ADNk en ratones negativos a las pruebas parasitológicas.....	57
5.8. Respuesta inmune humoral de los ratones experimentales infectados con los aislados de <i>T. cruzi</i>	61

5.8.1 Comparación de la respuesta inmune humoral de ratones infectados por vía intraperitoneal con $2,5 \times 10^3$ tripomastigotes de <i>T. cruzi</i> : aislados YAGUA y MACH-1.	61
5.8.2. Comparación entre la respuesta inmune humoral de los ratones infectados por vía oral con $2,5 \times 10^3$ tripomastigotes de <i>T. cruzi</i> : aislados YAGUA y MACH-1.....	64
6.DISCUSIÓN.....	67
7.CONCLUSIONES.....	78
8.BIBLIOGRAFÍA.....	80

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Distribución mundial de la enfermedad de Chagas y flujo de migraciones de personas infectadas desde Latinoamérica hacia regiones no endémica.....	2
Figura 2. Ciclo biológico del <i>Trypanosoma cruzi</i>	4
Figura 3. Interacción entre los ciclos epidemiológicos de <i>T. cruzi</i>	6
Figura 5. Formas de inoculación de <i>T. cruzi</i> con entrada aparente.....	9
Figura 6. Patología crónica del corazón chagásico..	10
Figura 7. Análisis del impacto del Programa de Control de la Enfermedad de Chagas en Venezuela.....	16
Figura 8. Estado actual de la enfermedad de Chagas en Venezuela	17
Figura 9. Esquema representativo de la molécula del mini círculo de <i>T. cruzi</i>	25
Figura 10. Evaluación parasitológica de los ratones infectados con los aislados de <i>T. cruzi</i> YAGUA y MACH-1 en el modelo murino durante la fase aguda de la infección.	39
Figura 11. Diagnóstico molecular de los aislados YAGUA y MACH-1 en la especie <i>Trypanosoma cruzi</i> mediante PCR ADNk.....	37
Figura 12. Evolución de la parasitemia de ratones infectados con $2,5 \times 10^3$ par /ratón por vía intraperitoneal con los aislados de <i>T. cruzi</i> aislado YAGUA (n=2) y <i>T. cruzi</i> aislado MACH-1 (n=5).....	42
Figura 13. Cinética de tripomastigotes en la cavidad peritoneal de ratones infectados con $2,5 \times 10^3$ parásitos/ratón por vía intraperitoneal, con los aislados de <i>T. cruzi</i> , aislado YAGUA (n=2) y aislado MACH-1 (n=5).	42
Figura 14. Evaluación microscópica del exudado peritoneal de ratones infectados con <i>Trypanosoma cruzi</i> aislado YAGUA.....	44
Figura 15. Evaluación microscópica del exudado peritoneal de ratones infectados con <i>Trypanosoma cruzi</i> aislado MACH-1.	44
Figura 16. Macrófago con amastigotes intracelulares obtenidos del líquido intraperitoneal de ratones infectados con <i>T. cruzi</i> aislado MACH-1.	45
Figura 17. Cinética de tripomastigotes en la cavidad peritoneal de ratones infectados con 50×10^3 tripomastigotes de <i>T. cruzi</i> aislado YAGUA por vía oral.	48
Figura 18: Evolución de la parasitemia del grupo de ratones infectados con 50×10^3 par/ratón de <i>T. cruzi</i> aislado MACH-1 por vía oral.....	50
Figura 19. Cinética de tripomastigotes en la cavidad peritoneal de ratones infectados con 50×10^3 par/ratón de <i>T. cruzi</i> aislado MACH-1 por vía oral.....	50
Figura 20: Evolución de la parasitemia de cuatro grupos de ratones infectados con el aislado MACH-1 de <i>Trypanosoma cruzi</i> con diferentes inóculos por vía oral.	51

Figura 21. Cinética de tripomastigotes en la cavidad peritoneal de ratones infectados por vía oral, con diferentes inóculos del aislado MACH-1de <i>Trypanosoma cruzi</i>	51
Figura 22. Evaluación histológica del tejido cardíaco de ratones infectados con el aislado YAGUA..	54
Figura 23. Diagnóstico molecular de la infección con <i>T. cruzi</i> mediante PCR ADNk de ratones inoculados con $2,5 \times 10^3$ tripomastigotes del aislado YAGUA negativos a las pruebas parasitológicas.....	57
Figura 24. Diagnóstico molecular de la infección con <i>T. cruzi</i> aislado YAGUA mediante PCR ADNk de ratones inoculados con 50×10^3 parásitos, vía oral y negativos a las pruebas parasitológicas.....	58
Figura 25. Diagnóstico molecular mediante PCR ADNk de la infección con <i>T. cruzi</i> aislado MACH-1 en ratones inoculados con $2,5 \times 10^3$ parásitos por vía oral.....	59
Figura 26. Diagnóstico molecular de la infección con <i>T. cruzi</i> aislado MACH-1 mediante PCR ADNk de ratones infectados con inóculos más elevados por vía oral.	60
Figura 27. Evolución de la respuesta humoral de tipo IgM en ratones infectados con $2,5 \times 10^3$ par/ratón por vía i.p con el aislado YAGUA y MACH-1.	63
Figura 28. Evolución de la respuesta humoral del tipo IgG en ratones infectados con $2,5 \times 10^3$ par/ratón por vía i.p con el aislado YAGUA y MACH-1.	63
Figura 29. Evolución de la respuesta humoral de tipo IgM en ratones infectados con $2,5 \times 10^3$ par/ratón por vía oral con el aislado YAGUA y MACH-1.	65
Figura 30. Evolución de la respuesta humoral de tipo IgG en ratones infectados con $2,5 \times 10^3$ par/ratón por vía oral con el aislado YAGUA y MACH-1.	65
Figura 31. Respuesta humoral de ratones infectados con diferentes inoculos del aislado de <i>T. cruzi</i> MACH-1.	67

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Condiciones del ensayo PCR ADNk <i>Trypanosoma cruzi</i>	26
Tabla 2. Programa de incubación y ciclos de PCR ADNk.....	26
Tabla 3. Resultados de la evaluación parasitológica y molecular del aislado YAGUA de <i>T. cruzi</i>	55
Tabla 4. Evaluación parasitológica y molecular del aislado MACH-1 de <i>T. cruzi</i>	56

LISTA DE ABREVIATURAS

Ac	Anticuerpo
ADNk	Acido desoxirribonucleico kinetoplasto
c.p.	Cavidad peritoneal
d.p.i.	Días post infección
ECh	Enfermedad de Chagas
ELISA	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas
ESRV	Entidad de Salud Regional de Venezuela
H&E	Hematoxilina y Eosina
HAI	Hemaglutinación
i.p.	Intraperitoneal
ICI	Infiltrado celular inflamatorio
IFI	Inmunofluorescencia indirecta
Ig	Inmunoglobulinas
MGG	May Grundwald-Giemsa
MSAS	Ministerio de Sanidad y Asistencia Social
OMS	Organización Mundial de la Salud
p.i.	Post infección
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
RI	Respuesta inmune
RIA	Radioinmunoensayo
SFM	Sistema Fagocítico Mononuclear
SI	Sistema inmunológico
SS	Solución salina

RESUMEN

La transmisión oral de *T. cruzi* al hospedador definitivo ocurre por la penetración del parásito a través de la mucosa buco-gástrica, pudiendo infectarse el ser humano por esta vía al ingerir alimentos contaminados con heces de chipos infectados. La relevancia de la transmisión oral ha incrementado en las últimas décadas, debido a los numerosos casos ocurridos en Colombia, Brasil y Venezuela. En nuestro país se ha reportado una incidencia de 242 casos de ECh debido a la transmisión oral, con una mortalidad de 3,3% entre los años 2007 y 2013.

Esta investigación pretende colaborar al conocimiento de la ECh que está siendo producida por la transmisión oral de *T. cruzi* en zonas urbanas del Distrito Capital-Venezuela. Para ello se llevó a cabo el estudio inmunoparasitológico de dos aislados del parásito provenientes del ciclo peridoméstico en el Distrito Capital. Los aislados procedentes del vertebrado *Didelphis marsupialis* y del insecto vector *Panstrongylus* sp., fueron denominados "YAGUA" y "MACH-1", respectivamente. Previo al estudio inmunoparasitológico se realizó el diagnóstico molecular de los flagelados mediante PCR ADNk, ubicándolos taxonómicamente en la especie *Trypanosoma cruzi*. Así mismo, se llevó a cabo la obtención de tripomastigotes contenidos en la cavidad peritoneal de ratones infectados previamente. Para evaluar la capacidad infectiva de estos tripomastigotes se inocularon grupos de ratones tanto por la vía intraperitoneal (i.p.) como oral, variando la cantidad de parásitos administrados y el aislado empleado. Este estudio se llevó a cabo durante la fase aguda (46 días).

Los resultados de las evaluaciones parasitológicas con el inóculo más bajo (2.500) mostraron diferencias en el comportamiento de los aislados al ser inoculados por vía intraperitoneal. Al emplear el mismo tamaño de inóculo por la vía oral, no se logró el establecimiento de la infección aguda con ninguno de los aislados. Un incremento de 20 veces el número de parásitos inoculados por esta vía, produjo un aumento en el porcentaje de infección para ambos aislados, respectivamente. No obstante, los valores de las pruebas parasitológicas al incrementar el inóculo oral fueron mayores para el aislado MACH-1, contrario a lo encontrado en la administración i. p. con 2.500 parásitos/ratón. El ensayo de inóculos aún más elevados (100.000, 200.000 y 400.000) del aislado MACH-1 por vía oral, mostró que el efecto parasitológico e inmunológico no fue proporcional a la cantidad de parásitos inoculados. La aplicación del diagnóstico molecular por PCR ADNk logró evidenciar el establecimiento de la infección en ratones que estuvieron parasitológicamente negativos durante toda la evaluación. La presencia de nidos de amastigotes a los 28 días post infección, puso en manifiesto el cardiotropismo del aislado venezolano "YAGUA".

El análisis inmunológico (ELISA) de los sueros obtenidos de ratones inoculados por vía intraperitoneal con los aislados *T. cruzi* YAGUA y MACH-1, evidenció la producción de anticuerpos del tipo IgM al inicio de fase aguda y luego de dos a tres semanas (21 y 25 d. p. i.), la producción de anticuerpos del isotipo IgG, persistiendo estos últimos durante el resto de la infección. Por otra parte, los sueros de los ratones infectados por vía oral en todos los grupos experimentales mostraron valores de IgM constantes y una producción elevada de anticuerpos IgG contra *T. cruzi* al inicio de la infección. Estos resultados parecen indicar que una respuesta inmunológica temprana podría haber sido efectiva en la eliminación del parásito al emplear inóculos bajos, mientras que para inóculos mayores esta respuesta podría haber resultado insuficiente. Los resultados obtenidos en esta investigación con *T. cruzi* en la transmisión oral, son muy preliminares por lo que se sugiere un estudio más exhaustivo de la IgG en suero durante la primera semana de infección para explicar su temprana aparición. Concentraciones hasta seis veces mayores de tripomastigotes en la cavidad peritoneal con respecto a la parasitemia, sugieren esta cavidad como un posible reservorio del parásito donde parece lograr evadir la respuesta inmunológica humoral.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. La Enfermedad de Chagas.

La Enfermedad de Chagas (ECh) también denominada Mal de Chagas, es considerada como una enfermedad desasistida que representa un importante problema de salud pública en Latinoamérica, zona endémica para esta dolencia desde el norte de México hasta el sur de Argentina y Chile (WHO, 2013). Según datos recientes de la Organización Mundial de la Salud (OMS) existen alrededor de 7 a 8 millones de personas infectadas, principalmente en Latinoamérica (WHO, 2013) A nivel mundial el número de muertes anuales ha disminuido de 45.000 durante el año 1990 a 12.500 en el 2006 y la incidencia anual durante este periodo ha disminuido de 700.000 a 41.000 (WHO, 2010).

Aunque inicialmente se caracterizó por ser una enfermedad propia del medio rural tropical de las zonas endémicas, en las últimas décadas se ha extendido hacia poblaciones urbanas de estos países. Así mismo se han reportado numerosos casos en Norte América y en otros continentes tales como Europa, Asia y Australia, debido a las migraciones humanas en busca de una mejor calidad de vida. Se estima que más de 25 millones de personas se encuentran en riesgo de adquirir la enfermedad en el mundo (Schmunis, G. 2007; Trillo y col., 2008; Coura y Albajar, 2010) (Figura 1).

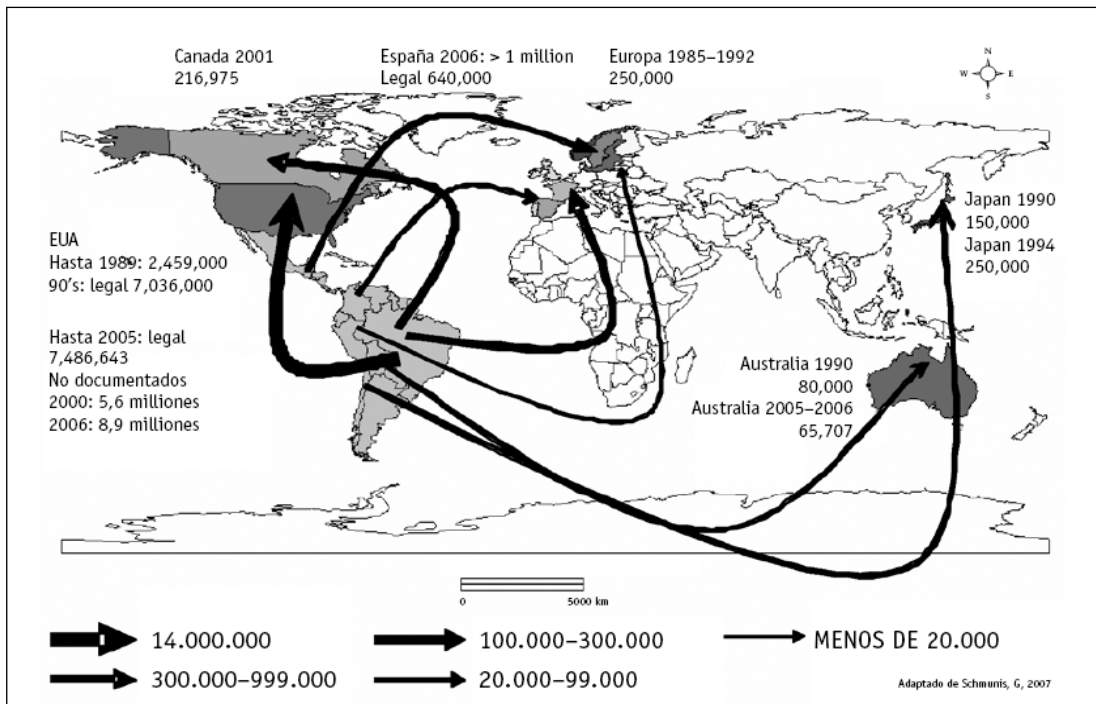


Figura 1. Distribución mundial de la enfermedad de Chagas y flujo de migraciones de personas infectadas desde Latinoamérica hacia regiones no endémicas. (Tomado de Schmunis, G., 2007).

1.2. *Trypanosoma cruzi*: el agente etiológico. Ciclo de vida.

El parásito *Trypanosoma cruzi* es un protozoo flagelado ubicado taxonómicamente en el Reino Protista, Subreino Protozoa, Phylum Sarcomastigophora, Clase Zoomastigophorea, Familia Tripanosomatidae, Orden Kinetoplastida (Levine y col., 1980). La especie *T. cruzi* es considerada como un conjunto de poblaciones de parásitos que circulan entre reservorios animales, humanos y vectores intradomiciliarios y silvestres (Botero y Restrepo, 1998). *T. cruzi* es un parásito heteroxénico cuyo ciclo de vida incluye vertebrados mamíferos e insectos hematófagos (Hemíptera, Reduviidae, Triatominae) que actúan como vectores (Rey, 1991). El ciclo de vida del parásito se inicia cuando el insecto vector, comúnmente denominado “chipo” se alimenta de la sangre de un mamífero infectado e ingiere los tripomastigotes sanguíneos, que son las formas infectantes para el

hospedador intermediario o vector. Los flagelados pasan al intestino del insecto y se transforman en epimastigotes, los cuales se multiplican por fisión binaria longitudinal y luego migran hacia el intestino posterior donde se convierten en tripomastigotes metacíclicos en el ámpula rectal(Figura 2). Cuando el vector infectado pica a un hospedador sano para alimentarse, defeca sobre la piel y junto con las heces libera los tripomastigotes metacíclicos (forma infectante para el hospedador definitivo),los cuales pueden penetrar a través de la lesión inducida por la probóscide del insecto al picar, heridas preexistentes en la piel, la conjuntiva del ojo ó bien por la mucosa oral. Inmediatamente, los tripomastigotes metacíclicos invaden las células del Sistema Fagocítico Mononuclear (SFM) en el sitio de inoculación y una vez dentro de las células se transforman en amastigotes que se multiplican por fisión binaria y luego se diferencian a tripomastigotes sanguíneos, antes ó después de romper la célula hospedadora (Figura 2). Este proceso de diferenciación dura aproximadamente 5 días (Contreras, 1994). A continuación, los tripomastigotes sanguíneos son capaces de parasitar células vecinas al sitio de inoculación o bien pueden pasar al torrente sanguíneo e invadir células de tejidos lejanos a la puerta de entrada. El ciclo biológico se completa cuando un triatomino sano se alimenta de la sangre del mamífero infectado (Figura 2) (De Souza, 2000; CDC, 2010).

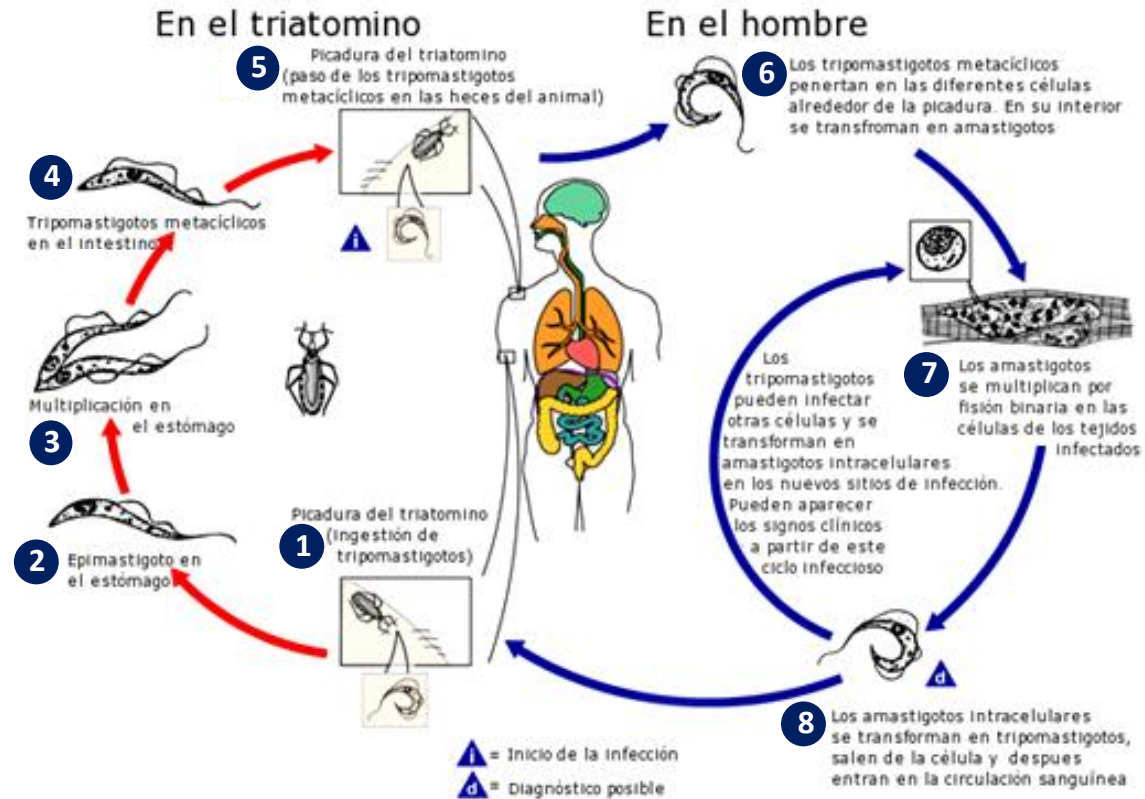


Figura 2. Ciclo biológico del *Trypanosoma cruzi*. (Tomado y modificado de Centers Disease Control and Prevention, 2010). **Ciclos epidemiológicos de *Trypanosoma cruzi***

Se han descrito tres ciclos epidemiológicos para *T. cruzi*: silvestre o selvático, peridoméstico y doméstico. El ciclo silvestre es una enzootia mantenida por triatominos y hospedadores en diferentes ecotopos naturales del continente americano, que se verifica desde tiempos remotos e involucra la interacción entre vectores (insectos triatominos hematófagos) y hospedadores silvestres (rabilpelados, cachicamos, perezas, ratas, etc.), manteniéndose un equilibrio ecológico entre *T. cruzi* y sus hospedadores naturales (Brener y col., 2000; Herrera y col., 2010). No obstante, el ser humano y las acciones antrópicas, tales como la deforestación, extracción de plantas y la construcción de casas e industrias, han producido una serie de cambios ecológicos que han propiciado el incremento del contacto entre los chipos infectados, los animales domésticos y el hombre (Wendel y col.,

1992). El uso de troncos de árboles y hojas de palmas como material de construcción para la vivienda rural (ranchos), con el consecuente transporte de triatominos infectados que allí habitan naturalmente, dio inicio a los restantes ciclos epidemiológicos del parásito. El ciclo peridoméstico incluye triatominos silvestres y animales que habitan en el peridomicilio humano tales como perros, gatos, ratas, ratones, cabras, gallinas, rabipelados, cachicamos, entre otros, que les sirven como fuente de alimento a los chipos que visitan el peridomicilio como por ejemplo *Panstrongylus geniculatus*.

El ciclo domestico resulta del contacto entre el humano y mamíferos domésticos con vectores que han logrado invadir y establecerse dentro de las viviendas. Tal es el caso de *Rhodnius prolixus* del que se ha reportado su domiciliación desde 1960. Recientemente se ha reportado una tendencia hacia la domiciliación de *Panstrongylus geniculatus*, habitando grietas o cuevas debajo del piso, donde se logra instalar si el ambiente es suficientemente húmedo y existen ratas o ratones como principal fuente de alimento (Felicangeli, 2009; Reyes-Lugo, 2011).

En este sentido, como se observa en la figura 3, los vectores del ciclo peridoméstico pueden gradualmente invadir las viviendas humanas y adaptarse al ciclo doméstico (Coura, 2013).

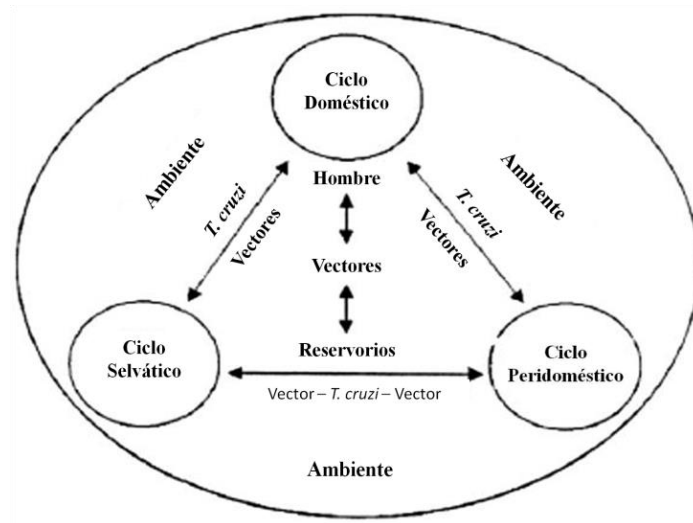


Figura 3. Interacción entre los ciclos epidemiológicos de *T. cruzi*. (Tomado y modificado de Coura y Dias, 2009).

1.3. Mecanismos de transmisión de la enfermedad de Chagas.

Entre los principales mecanismos de transmisión de *T. cruzi* al ser humano se encuentran la transmisión vectorial, transfusiones sanguíneas, transmisión transplacentaria, vía oral y otros mecanismos menos frecuentes como los accidentes laborales:

4.5.3. Transmisión vectorial: ocurre debido al contacto entre el hombre y las heces del vector donde se encuentran las formas infectantes del parásito. Esto ocurre cuando el chipo se alimenta sobre el hospedador y defeca liberando los tripomastigotes metacíclicos (Figura 2). Es el mecanismo de contagio más frecuente y responsable de más del 95% de los casos diagnosticados de ECh en zonas endémicas.

2. Transmisión mediante transfusiones sanguíneas: las formas sanguíneas de *T. cruzi* presentes en donadores infectados son transmitidas a receptores sanos durante las transfusiones en los centros hospitalarios, siendo mayor el riesgo en zonas endémicas. No obstante, en los últimos años la transmisión por esta vía se han convertido en un problema potencial de salud pública en países desarrollados de Europa y Asia, así como en Estados

Unidos y Canadá, donde cada vez son más frecuentes las migraciones de personas provenientes de zonas endémicas del Mal de Chagas (Schmunis, G., 2007; Gascón y col., 2010).

3. Transmisión transplacentaria, también denominada transmisión congénita ó vertical: el parásito puede alcanzar la circulación fetal por vía hematógica como resultado de una placentitis. En la placenta pueden encontrarse focos inflamatorios agudos y/o crónicos, áreas de necrosis y parasitismo de las células trofoblásticas y macrófagos, pudiendo penetrar el parásito en forma activa hacia la circulación fetal (Gürtler y col., 2003). La detección de la ECh en mujeres embarazadas y recién nacidos no se realiza habitualmente en la mayoría de los países endémicos, por lo que la magnitud de la transmisión congénita de este agente patógeno continúa siendo un problema de salud pública en Latinoamérica (Piat y col, 2009).

4. Transmisión oral: ocurre de forma accidental al ingerir alimentos y/o bebidas contaminados con heces de chipos infectados por *Trypanosoma cruzi*, pudiendo penetrar el parásito a través de la mucosa oral (Dias, 2006; Alarcón de Noya y col., 2010). Otra forma es mediante la ingestión de carne cruda o mal cocida de marsupiales infectados que son reservorios naturales del parásito, como por ejemplo *Didelphis marsupialis*.

Estudios en ratones infectados por vía oral con *T. cruzi*, indican que los tripomastigotes metacíclicos son capaces de invadir el epitelio de la mucosa gástrica (Hoft, 1996). Durante este proceso intervienen glicoproteínas (Gp) específicas del estadio tripomastigotes, como la Gp82 que se une a la mucina gástrica y a las células epiteliales mediante la activación de la señalización con Ca^{2+} promoviendo la internalización del parásito. El proceso de infección también es influenciado por la Gp90, otra molécula

estado-específica de los tripomastigotes que regulan negativamente el proceso de infección (Yoshida, 2009) (Figura 4).

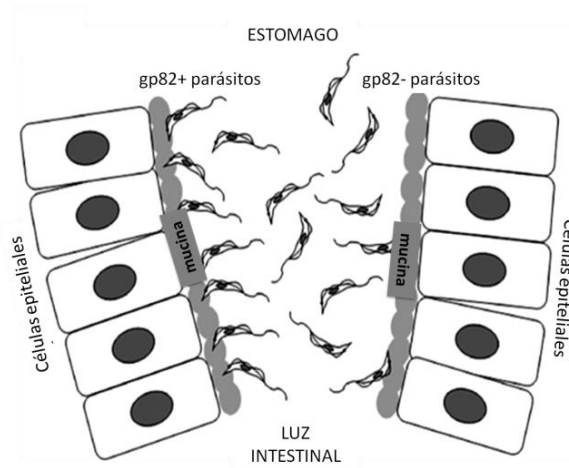


Figura 4. Interacción de *T. cruzi* con la mucina gástrica en la infección oral. Se observa que los tripomastigotes Gp82 deficientes poco interactúan con la mucina gástrica en comparación con la población de tripomastigotes metacíclicos que expresan Gp82. (Tomado y modificado de Yoshida, 2009).

5. Otros mecanismos menos frecuentes pero no menos importantes, son los trasplantes de órganos y los accidentes en los laboratorios de investigación debido a la manipulación de instrumentos punzantes contaminados con el parásito.

1.4. Fases de la enfermedad de Chagas.

Se han descrito dos etapas principales de la enfermedad: una inicial denominada **fase aguda**, que comienza a partir del momento en el que los parásitos ingresan al organismo por cualquiera de los mecanismos mencionados anteriormente y una segunda etapa conocida como la **fase crónica**, entre ambas existe un período de duración variable llamado fase indeterminada o inaparente.

Durante la fase aguda, la parasitemia (parásitos en sangre) es elevada y puede comprender una serie de fenómenos clínicos tales como, el signo o puerta de entrada del parásito (Figura 5), síntomas generales y alteraciones sistémicas que se establecen entre los primeros 2 y 4 meses de infección después de un período de incubación, que puede variar entre 4 a 10 días en el hombre y animales experimentales, tiempo requerido para el desarrollo de dos generaciones de parásitos (Rassi y col., 2000). Entre los síntomas generales y de aparición precoz de la fase aguda destacan el malestar general, fiebre continua o intermedia, linfadenitis generalizada, dolores musculares, escalofríos, hepatoesplenomegalia y esplenomegalia, además el individuo describe debilidad y pérdida del apetito, lo que ocasiona una sensación de cansancio progresivo debido al daño cardíaco que empieza a manifestarse desde esta fase (Botero y Restrepo, 1998; Becerril, 2011) o bien por complicaciones digestivas (megacolon), cardio-digestivas y del sistema nervioso (Wendel y col., 1992).

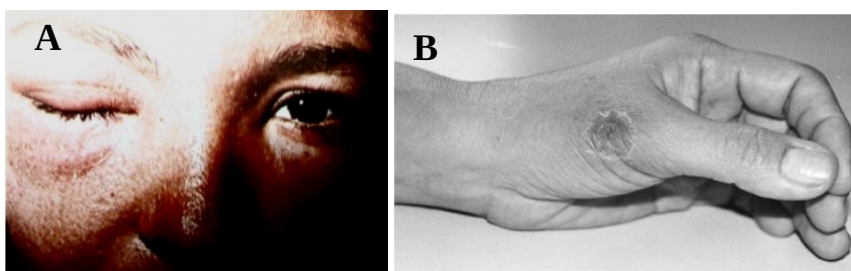


Figura 5. Formas de inoculación de *T. cruzi* con entrada aparente A. Complejo oftalmoganglionar o edema unilateral-bipalpebral conocido como signo de Mazza-Romaña. **B.** Chagoma de inoculación en la piel. (Tomado de Salfelder y col., 1977; Kinochita-Yanaga y col., 2009).

Los individuos más susceptibles de padecer las patologías de la ECh aguda con consecuencias fatales son los niños menores de 5 años y las personas inmunosuprimidas. Sin embargo, la mayoría de los pacientes (95%) logran superar este período pasando a una **fase crónica**, que comienza con una **etapa indeterminada** caracterizada por la ausencia de manifestaciones clínicas, electrocardiográficas y radiológicas de los fenómenos cardíacos

y/o digestivos en los pacientes. Es un período silencioso en el que la presencia de parásitos circulantes es rara, ya que estos migran hacia órganos y tejidos en donde invaden células y ocurre la multiplicación del parásito y logran evadir la respuesta inmunológica humoral del hospedador en la circulación sanguínea, este periodo puede extenderse de 10 a 20 años antes de que el paciente pueda presentar los daños característicos de la **etapa crónica**(Ribeiro y Costa, 2000). Pueden presentarse taquicardias y arritmias, y en algunos casos hasta puede ocurrir la muerte súbita sin causa aparente. Sin embargo, por lo general solo un tercio de los pacientes desarrollan los síntomas de la etapa crónica. Los daños patológicos de la fase crónica pueden tener varios orígenes, tanto cardíaco como digestivo (esófago y/o colon), pudiéndose presentar ambas formas solas o en asociación y con menos frecuencia también puede involucrar el sistema nervioso central y periférico (Wendel y col., 1992).

El cuadro clínico con cardiopatías chagásicas crónicas se caracteriza por la presencia de nidos de amastigotes en el interior de las fibras cardíacas (figura 6A), arritmias, insuficiencia cardíaca y trombo embolismos. El crecimiento ventricular es común debido a una dilatación progresiva que conlleva a una cardiomegalia visible (figura 6B). (Salferder, 1977; Wendel y col., 1992; Brener, y col., 2000).

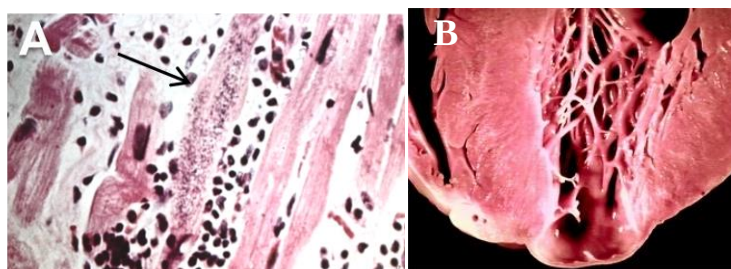


Figura 6. Patología crónica del corazón chagásico. A. Corte de corazón postmortem de paciente venezolano con miocarditis chagásica crónica. Se observa un nido de amastigotes rodeado de infiltrado celular inflamatorio (flecha) **B. Cardiopatía chagásica crónica.** Típica lesión apical “aneurismática”. (Tomado de Salferder y col, 1977; Andrade, 2011).

1.5. Diversidad genética de *T. cruzi* y su relación con las diferentes formas clínicas de la ECh.

La prevalencia de estas manifestaciones ha sido vinculada a la cepa del parásito y su origen geográfico, hecho que es atribuido a la heterogeneidad de cepas de *T. cruzi* que pueden tener diversos tropismos (Rassi y Luquetti, 1992). Se ha reportado que 27% de los pacientes presentan cardiopatías crónicas, mientras que las alteraciones digestivas y neurológicas crónicas se manifiestan en un 6 y 3%, respectivamente (Marin-Neto y col., 2000).

En este sentido, las poblaciones y subpoblaciones de *T. cruzi* muestran una enorme variabilidad genética, asociada a las formas clínicas. La identificación de significativas similitudes entre algunas poblaciones reveladas por diferentes marcadores moleculares y el análisis de isoenzimas permitió agrupar las poblaciones de *T. cruzi* en seis unidades discretas de tipificación (DTU's), clasificadas como *T. cruzi* (Tc) I, TcII, TcIII, TcIV, TcV y TcVI (Zingales y col., 2009). Otros autores han demostrado que existe diversidad genética intraespecífica dentro de *T. cruzi* I sugiriendo la existencia de genotipos asociados al ciclo doméstico (TcIa), peridoméstico (TcIb) y selvático (TcId) (Guhl y Ramírez, 2011). Estas variaciones pueden ser reflejadas en la morfología, letalidad, virulencia e incluso en la tasa de infectividad de las cepas que circulan en diferentes fuentes incluyendo a humanos de los países endémicos, (Carneiro y col., 1991; Pedreira de Castro y Brener., 1985). El mecanismo por el cual las diferentes formas clínicas de la ECh se establecen aun no se conoce con exactitud. Sin duda factores asociados al paciente están involucrados, pero cada vez es más evidente la existencia de un papel fundamental asociado a los genes del parásito. En Venezuela se ha detectado con amplio predominio la presencia de *T. cruzi* I (Gonzales y

col., 2004) el cual ha sido relacionado con cardiopatías, sin embargo aislados similares del parásito pueden ser asociados a diferentes formas clínicas, (Zingales y col., 2009) lo que apunta a la importancia de otros factores.

1.6.Respuesta inmunológica durante la infección por *T. cruzi*.

Como ocurre en otras infecciones por microorganismos patógenos, la infección por *T. cruzi* moviliza múltiples mecanismos celulares y humorales de la respuesta innata y adaptativa (dos Reis y Lopes, 2000). La cronicidad de las infecciones chagásicas es un indicativo de que el sistema inmunológico (SI) es incapaz de erradicar al parásito, esto se debe a que éste ha sido capaz de desarrollar mecanismos para evadir la respuesta inmune (RI) a lo largo de la relación parásito-hospedador (Rosales-Borjas y Ortiz-Ortiz, 2008) y establecer una infección que le permita sobrevivir. En este sentido, se han descrito tres mecanismos principales: 1) la inhibición de la convertasa de C3 del sistema del complemento; 2) la expresión de proteínas protectoras en su superficie, y 3) el mimetismo con moléculas de la célula hospedadora.

En el comienzo de la repuesta inmune adaptativa contra *T. cruzi* también ocurre la activación de linfocitos B e hiperproducción de inmunoglobulinas (Ig). Así mismo comienza la producción del isotipo IgM como indicadora de una fase temprana de la infección, acompañado del incremento de IgA totales o específicas. Seguidamente, ocurre la disminución de títulos de IgM y la aparición anticuerpos (Ac) del isotipo IgG de manera simultánea, los cuales persisten durante el resto de la infección, indicativo de la fase indeterminada y/o crónica tardía (Umezawa y col., 1996, dos Reis y Lopes, 2000).

1.7. Métodos para el diagnóstico parasitológico, inmunológico y molecular de la enfermedad de Chagas.

El diagnóstico etiológico de *T. cruzi* puede realizarse por la detección de las formas sanguíneas del parásito a través de métodos parasitológicos directos o indirectos. En la fase aguda con parasitemia evidente, debe procurarse la realización del diagnóstico por métodos parasitológicos directos tales como: examen microscópico directo de sangre, hematocrito, extendidos de sangre teñida con la coloración de May Grundwald-Giemsa (MGG) o por métodos indirectos que se basan en la capacidad de multiplicación del parásito como el xenodiagnóstico (empleo de insectos vectores sanos) y el hemocultivo (Mansfield, 1984). Durante la fase crónica la cantidad de parásitos circulantes es muy escasa o casi nula y estos métodos son poco aplicables.

Los métodos inmunológicos que permiten evaluar la presencia de anticuerpos anti-*T. cruzi* en el suero de pacientes y animales experimentales, son empleados durante las fases aguda y crónica de la infección. Existen más de 30 métodos inmunológicos que pueden ser utilizados, siendo todos variantes de un mismo fundamento biológico que consiste en revelar la capacidad de la respuesta inmune (humoral o celular) del hospedador frente al mosaico de antígenos que ofrece *T. cruzi* (Contreras, 1994). Entre los ensayos más frecuentemente empleados están: inmunofluorescencia indirecta (IFI), hemaglutinación (HAI) y el Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) (Rey, 1991; Becerril, 2011). En la actualidad la técnica de ELISA es el método inmunológico más sensible y más comúnmente utilizado en los laboratorios clínicos, solo es comparable con las técnicas de radioinmunoensayo (RIA) que detectan el progreso de la respuesta inmune humoral del paciente infectado con el empleo de isótopos radiactivos. Finalmente, otra prueba inmunológica más compleja, altamente sensible y específica es el “immunoblotting”,

empleado para detectar proteínas antigénicas de *T. cruzi* capaces de desencadenar una respuesta humoral en los pacientes. Este último ensayo ha mostrado resultados prometedores y puede ser utilizado como prueba de confirmación tanto en la fase aguda como en las etapas crónicas de la enfermedad según el Consenso del Ministerio de Salud de Brasil (Consenso del Ministerio de Salud de Brasil, 2005).

Por otra parte, en las últimas décadas los ensayos moleculares han sido implementados para realizar la detección de ADN de *T. cruzi*, tanto en fase aguda como crónica y la técnica más frecuente es la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). A este nivel el fundamento biológico de la técnica diagnóstica y el metodológico se superponen, ya que los mecanismos de defensa del hospedador garantizan la existencia de fragmentos de ADN del parásito en tejidos como el corazón, sangre o bien en la orina (Luquetti y Rassi., 2000; Sanoja, 2010). Es de hacer notar que en el caso de que la muestra problema provenga de un insecto vector, se debe descartar un posible falso positivo debido a la presencia de ADN de *Trypanosoma rangeli*, otro tripanosomatideo que emplea los mismos hospedadores intermediarios y reservorios que *T. cruzi*. De acuerdo a la metodología que emplearemos en este trabajo (Gomes y col., 1998) el ensayo de (PCR ADN kinetoplasto) para *T. cruzi*, emplea dos cebadores (121 y 122) induciendo la amplificación de un fragmento de 330 pb (pares de bases) derivado de una región variable y otro fragmento de 750 pb de la amplificación de dos regiones variables adyacentes (Junqueira y col., 2005). Mientras que *T. rangeli* genera productos entre 330-450 pb y 760 pb (Vallejo y col., 2002) pudiendo generar confusión en el diagnóstico, por lo que en ocasiones es necesario realizar la tipificación (Lewis y col., 2009). Otros métodos moleculares menos empleados son la clonación de antígenos clonados molecularmente y la hibridación molecular con sondas marcadas.

2. ANTECEDENTES

En Venezuela los primeros estudios sobre la enfermedad de Chagas se deben fundamentalmente al médico José Francisco Torrealba, quien inició sus investigaciones en el año 1932 en el estado Guárico, una de las principales zonas endémicas para esta dolencia hasta la fecha (Torrealba, 1935; Acquatella, 2003). Posteriormente, el Dr. Félix Pifano incursionó en el campo de la epidemiología de la ECh y reportó una metodología para la infección chagásica a partir de una mezcla de leche y heces de *R. prolixus* y a través de la vía buco-gástrica en perros (Pifano 1941), coincidiendo ambos en señalar, la importancia de esta enfermedad como un problema de salud pública y social en nuestro país desde aquel entonces. Así mismo, destacaron la influencia de las condiciones precarias de vida, insalubridad y construcción de viviendas (ranchos) con techo de palmas (hábitat natural de *R. prolixus*) y paredes de bahareque, en el mantenimiento de esta zoonosis, tal como lo siguen reportando otros investigadores en la actualidad (Feliciangeli y col., 2009).

A partir del año 1959 el Ministerio de Sanidad y Asistencia Social (MSAS) dirigió esfuerzos, presupuestos, y experticias para combatir el Mal de Chagas, iniciando una campaña denominada Programa de Control de la Enfermedad de Chagas (PCECH) en el año 1959 (Figura 7) (Guerrero y col., 1965).

Debido al PCECH en Venezuela la prevalencia de la infección en los bancos de sangre se logró mantener por debajo del 1% para el año 1999 (Aché y Matos, 2001). Así mismo, se reportó una disminución paulatina pero sostenida de los índices de seroprevalencia entre los años 1958 y 1999 de 44,5% a 8,1% y una disminución de la seroprevalencia de 20,5% a 0,8% en niños menores de 10 años de edad (Aché y Matos, 2001). Los índices de infestación de casas por *Rhodnius prolixus* también declinaron

notablemente, de 60-80% en la década 1958-1968 hasta 1,6-4,0% entre 1990 y 1998 (Ach  y Matos, 2001). En la década de los años 90, la reemergencia de la Malaria y la aparición del dengue hemorrágico desviaron los recursos presupuestarios del MSAS (Feliciangeli y col., 2009) y los efectos adversos no tardaron en visualizarse. Efectivamente, a finales de 1999 el MSAS reportó un incremento de la incidencia de la enfermedad de Chagas, indicando la existencia de niños infectados (indicadores de transmisión activa) por *Trypanosoma cruzi* en algunos estados del país (DSA, 2000).

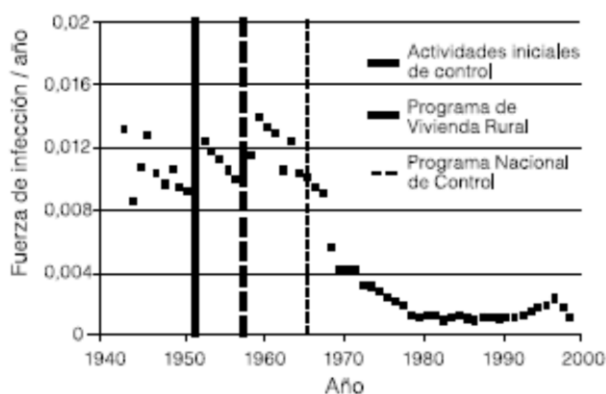


Figura 7. Análisis del impacto del Programa de Control de la Enfermedad de Chagas en Venezuela (Tomado de Feliciangeli y col., 2009).

Según datos epidemiológicos emitidos por la Entidad de Salud Regional de Venezuela (ESRV) la prevalencia de la ECh en el Territorio Nacional era de 1,15% (310.000 casos en un total de 26.749.000 habitantes evaluados) en el año 2005. Una extrapolación de estas cifras, permitió calcular un incremento a 350.000 casos para el año 2009 (Rísquez, 2009). Estudios epidemiológicos realizados por Rodríguez-Bonfantes y colaboradores (2007) señalan que ejemplares de *Rhodnius prolixus* y *Panstrongylus geniculatus* capturados en el Municipio Andrés Eloy Blanco del estado Barinas, presentaron un índice de infección por *T. cruzi* de 20% y 5,07%, respectivamente. Estos resultados sugieren la existencia de una transmisión activa de la enfermedad de Chagas en

el Municipio Andrés Eloy Blanco en las últimas dos décadas, y que *P. geniculatus* podría estar substituyendo a *R. Prolixus* como vector de la enfermedad de Chagas (Rodríguez-Bonfantes y col., 2007). A pesar del progreso alcanzado por el PCECH, el incremento en el número de casos agudos detectados durante la última década en nuestro país es indicativo de un repunte de la parasitosis (Añez y col., 1999). Estudios realizados en 233 pacientes con un diagnóstico clínico presuntivo de enfermedad de Chagas, procedentes de 10 estados de Venezuela reportaron: 6 casos agudos (2,6%), 90 casos crónicos (38,6%) y 137 casos diagnosticados como en fase indeterminada (58,8%) (Añez y col., 2003). Estas son evidencias del aumento de casos de ECh en las zonas rurales del país pese al programa de control, en su mayoría en estados de la región occidental de Venezuela (Barinas, Mérida, Trujillo, Portuguesa y Zulia). En la siguiente figura se muestra el mapa de Venezuela resaltando los estados donde existen casos de ECh. En color naranja se muestran los estados endémicos reportados (Acquatella, 2003), y en color verde los estados en donde ha emergido más recientemente la enfermedad de Chagas (1995-2013).



Figura 8. Estado actual de la enfermedad de Chagas en Venezuela. En color naranja se observan los estados donde se reportó la existencia de casos de ECh entre los años 1986-1995. De color verde se muestran los estados donde, se reportaron casos en la actualidad (2013). (Tomado y modificado de: Acquatella, 2003) Los números indican los estados

Dado que nuestra investigación estará mayormente enfocada hacia el estudio de la transmisión oral por aislados venezolanos de *T. cruzi*, a continuación describiremos algunos hechos importantes relacionados con esta vía de infección haciendo énfasis en lo reportado para Venezuela. Aunque la mayoría de los casos de ECh por transmisión oral se han producido en Brasil, también se han detectado casos en otros países de Latinoamérica como Colombia, Argentina, Venezuela y Ecuador en áreas no endémicas para la ECh. Las investigaciones sugerían que el mecanismo de transmisión más probable era la vía oral, dado que en todos los casos se incluyen a grupos estrechamente vinculados al consumo de jugos de frutas artesanales ó frutas directamente contaminados con el contenido intestinal de vectores infectados (Dias, 2006; Valente y col., 2006). El primer caso documentado de transmisión oral fue en Brasil (Teutonia, Río Grande del Sur) en el año 1965 donde se registraron 17 pacientes con enfermedad de Chagas aguda simultánea (Pereira y col., 2009). Durante el año 2006, se reportaron otros 94 casos de transmisión de *T. cruzi* por vía oral en el norte y noreste de Brasil, con 6 casos fatales y todos relacionados al consumo de jugo de “açai berry” (fruta de la palma acai) o jugo de caña posiblemente contaminado con triatomos infectados con *T. cruzi* (Pereira y col., 2009).

Los primeros indicios sobre la presencia de *P. geniculatus* en Venezuela datan del año 1859, cuando fue reportado por Stal en las faldas del Cerro El Ávila (Distrito Capital) y en la Guaira (Edo. Vargas) (Reyes-Lugo, 2011; Ramírez-Pérez, 1985). Casi un siglo y medio después, un grupo de investigadores alertaron sobre el avance de este triatomo hacia el ambiente doméstico, indicando que bajo ciertas condiciones socio-ambientales *P. geniculatus* podría ser capaz de colonizar el domicilio (Reyes-Lugo, 2000; Feliciangeli y col., 2009). En este sentido, el análisis del contenido intestinal de varios especímenes recolectados en el Distrito Capital y en los estados Miranda y Vargas, resultaron positivos a

la presencia de sangre humana en 98,1 % de los especímenes evaluados (Carrasco y col., 2005). Estos datos demuestran que la alimentación de *P. geniculatus* con sangre humana no parece ser accidental y que su tasa de infección por *T. cruzi* es elevada en un área que no es considerada endémica para la enfermedad de Chagas, según el Programa Nacional de Control. La situación es particularmente impactante ya que ocurre en el Distrito Capital, donde existe una gran concentración de habitantes siendo vulnerables individuos de cualquier clase social, tanto aquellos que viven en casas de bajos recursos en condiciones precarias, como aquellos de mayor nivel socio-económico que habitan en zonas residenciales, donde el ciclo peridoméstico de *Didelphis marsupialis/Rattus rattus*–*P. geniculatus*–humano, parece estar ocurriendo exitosamente (Carrasco y col., 2005).

Varios investigadores han sugerido la necesidad de alertar a los médicos sobre esta nueva situación epidemiológica y el manejo adecuado de personas infectadas (Carrasco y col., 2005), ya que en la última década se han presentado 5 de microepidemias de ECh en zonas urbanas de Venezuela (Municipio Chacao, Parroquias Antímano y Coche-Distrito Capital, Chichiriviche Edo. Vargas y Rubio Edo. Táchira) con un mismo patrón, en el cual los afectados son grupos de personas estrechamente relacionadas y han tenido como factor común haber consumido frutas o jugos caseros. Un total de 245 personas infectadas y 8 fallecidos han sido los casos confirmados desde 2007 hasta 2013 (Alarcón de Noya y col., 2010; Prensa Nacional).

En este sentido, a finales del año 2007 fue detectado un número importante de casos de Chagas agudo en una comunidad educativa del Municipio Chacao, Estado Miranda. Los estudios sugieren que se pudieron haber infectado con *T. cruzi* por vía oral al ingerir alimentos contaminados con especímenes de *P. geniculatus* infectado. Se registró la muerte de un niño de 5 años y se detectaron anticuerpos anti-*T. cruzi* en 123 individuos (alumnos y

maestros) (Alarcón de Noya, 2010). A comienzos del año 2009 fue detectado otro brote similar de Mal de Chagas en una Escuela Municipal de Chichiriviche de la Costa, Estado Vargas, con un total de 58 personas contaminadas con *T. cruzi*, 4 de ellos fueron fatales (tres menores de 12 años y un adulto) (García, 2012).

Durante el año 2010, se detectó un tercer brote de Mal de Chagas en el barrio La Pedrera, Antímano, Distrito capital, en el que se evaluaron clínicamente 18 casos y se evidenció la presencia de *T. cruzi* en 78% de los pacientes mediante un examen microscópico directo de sangre. Estos pacientes presentaron síntomas tales como: fiebre (95%), mialgia (70%), diarrea y tos seca (35% a 40%), edema de extremidades y somnolencia (20%), astenia, incapacidad para la marcha y escalofríos (15%), náuseas o vómitos (10%), taquicardia y palpitaciones (5%). El examen físico y por ultrasonido reveló hepatoesplenomegalia en 14 individuos (78%), derrame pericárdico en 9 personas (50%), 2 casos con derrame pericárdico severo (11%) y 5,5% con crecimiento ventricular izquierdo. Estos síntomas sugieren el cardiotropismo del o los aislados de *T. cruzi* implicados (Comisión de epidemiología, Venezuela, 2010). Se pudo constatar que todos los afectados consumieron alimentos caseros que habían sido preparados con frutas. Un ejemplar de *P. geniculatus* fue localizado en el interior de la vivienda donde se había elaborado el alimento y su evaluación demostró la presencia de *T. cruzi* (Comisión de epidemiología, Venezuela, 2010). En el año 2011 en el estado Táchira, Rubio, ocurrió el cuarto brote con un total de 6 personas afectadas y 1 fallecido. Posteriormente en el año 2012 se reportó otro brote de ECh agudo en la parroquia Coche, Dtto. Capital implicando a 4 personas infectadas (Marcano, 2012).

Es de hacer notar que este problema se ha visto agravado por la falta de una quimioterapia 100% eficaz contra la ECh y la poca disponibilidad del medicamento

(Benzonidazol ®Laboratorios Roche) en nuestro país durante los brotes orales citados anteriormente.

Dado lo anteriormente expuesto, con esta investigación pretendemos contribuir a la caracterización inmunoparasitológica de aislados venezolanos de *Trypanosoma cruzi* que se encuentran circulando en el ciclo peridomiciliario (*Panstrongylus* sp. y *Didelphis marsupialis*) en zonas urbanas del país. Nuestros resultados pretenden colaborar al conocimiento de la enfermedad de Chagas experimental producida por estos aislados, posiblemente involucrados en la transmisión oral que está ocurriendo en las zonas urbanas del Distrito Capital. El empleo del modelo murino nos permitirá reproducir en el ratón las fases de la enfermedad de Chagas, para así extrapolar nuestros resultados al comportamiento del parásito en el hombre.

2. OBJETIVOS

3.1. Objetivo general.

Realizar la evaluación inmunoparasitológica de aislados de *Trypanosoma* sp. provenientes de insectos y reservorios del ciclo peridoméstico, infectados naturalmente en el Distrito Capital, Venezuela.

3.2. Objetivos específicos.

1. Estandarizar la obtención, purificación y conteo de tripomastigotes contenidos en la cavidad abdominal de ratones infectados experimentalmente.
2. Evaluar y comparar parasitológicamente los aislados de *Trypanosoma cruzi* proveniente de *Panstrongylus* sp. y *Didelphis marsupialis* en grupos de ratones inoculados por las vías intraperitoneal y oral, durante la etapa aguda de la infección.
3. Determinar el posible tropismo cardíaco de los aislados de *T. cruzi* y la presencia de infiltrado celular inflamatorio en el corazón de los ratones infectados.
4. Analizar la respuesta inmune de anticuerpos IgM e IgG contra *T. cruzi* en los animales de los diferentes grupos experimentales, durante la infección aguda.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Material biológico.

Para llevar a cabo la evaluación inmunoparasitológica de los aislados de *T. cruzi* se utilizó el modelo murino.

- a. Animales: se emplearon ratones hembras de la cepa NMRI, de 6 a 8 semanas de edad y procedentes del Bioterio del Instituto de Biología Experimental (IBE), Universidad Central de Venezuela.
- b. Parásitos: se trabajó con dos aislados de *Trypanosoma* sp.:
 1. Aislado “YAGUA” proveniente de un ejemplar joven de *Didelphis marsupialis*, capturado en las instalaciones del IBE, Colinas de Bello Monte, Municipio Baruta, Distrito Capital, Venezuela.
 2. Aislado “MACH-1” proveniente de *Panstrongylus* sp. capturado en el interior de una vivienda ubicada en la Urb. Macaracuay, Municipio Sucre, Estado Miranda. Venezuela.

Ambos aislados habían sido extraídos directamente de sus hospedadores silvestres por investigadores del Laboratorio de Inmunología y Quimioterapia del IBE entre los años 2010 y 2013.

4.2. Caracterización genética de los aislados de *Trypanosoma* sp. YAGUA Y MACH-1.

4.2.1. Obtención de las muestras.

Se emplearon muestras de sangre de ratones NMRI previamente infectados con sendos aislados para realizar la evaluación molecular. Para ello, sangre de la cola previamente cortada, fue extraída y recolectada en tubos Eppendorf® en volúmenes de 200µL/tubo. Las muestras fueron conservadas a -20°C hasta su uso. De igual forma se

obtuvieron muestras de sangre de los ratones experimentales en los que se realizó un diagnóstico molecular para corroborar la infección con *T. cruzi* en aquellos casos en que ninguna de las pruebas parasitológicas aplicadas dio resultados positivos (ver más adelante apartado 4.4).

4.2.2. Aislamiento del ADN total.

Se utilizó el estuche (“kit”) Genomic DNA Extraction Kit, marca comercial AccuPrep®.

La técnica está basada en el empleo de columnas de sílica que enlazan específicamente el ADN en presencia de sales caotrópicas (tampón de lavado suministrado en el “kit”). De esta manera, las muestras de sangre completa fueron procesadas en las columnas siguiendo las instrucciones de la casa comercial. El ADN fue separado de la sílica por un cambio de pH debido a la adición del buffer de elución (10 mM Tris-Cl pH 8,5). Aunque no fue determinada la concentración de ADN, este protocolo permite obtener 3 a 6µg de ADN genómico en 200 µl de tampón de elución (≈30ng/µl) de acuerdo a la casa comercial. Las muestras de ADN total fueron almacenadas a 4°C hasta su uso.

4.2.3. Caracterización del taxón especie (*Trypanosoma cruzi*).

La caracterización genética de los aislados como especie *Trypanosoma cruzi*, se llevó a cabo mediante el ensayo de PCR ADNk siguiendo el protocolo descrito por Gomes y colaboradores (1998). En este sentido, se emplearon los cebadores 121 y 122 (Bioneer) de secuencias 5'-AAATAATGTACGGGKGAGATGCATGA-3' y

5'-GGTTCGATTGGGGTTGGTGTAATATA-3, respectivamente. Estos cebadores se unen específicamente a regiones conservadas del mini círculo del ADNk (Figura 9) y el ensayo amplifica preferencialmente un segmento de 330pb correspondiente a una de las cuatro regiones variables del mini círculo (Gomes y col., 1998).

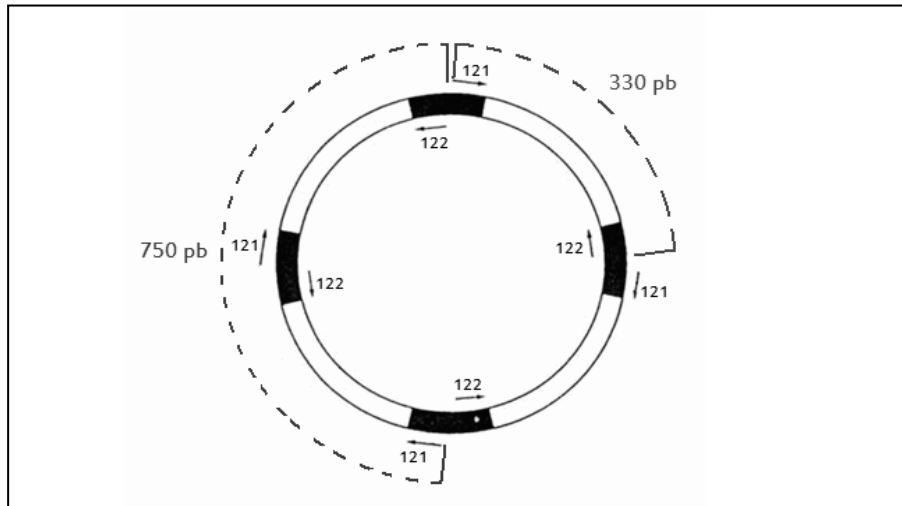


Figura 9. Esquema representativo de la molécula del mini círculo de *T. cruzi*. Se representan las 4 regiones de secuencias conservadas (barras negras), cuatro regiones de secuencias variables (barras blancas), las posiciones de los iniciadores 121 y 122 de la PCR (flechas) y los respectivos productos de amplificación de 750 y 330 pb (líneas punteadas). (Tomado de Schijman, 2008).

Como control positivo de la reacción de PCR ADNk se empleó ADN genómico de *T. cruzi* de las cepas 196 y CL Brener y como control negativo agua milli-Q. Se utilizaron 60ng (2µl) de ADNk en cada reacción y el programa de PCR se llevó a cabo en un Termociclador (MJ Research, modelo PTC-200). En las tablas 1 y 2 se describen las condiciones utilizadas en este ensayo.

Tabla 1. Condiciones del ensayo PCR ADNk *Trypanosoma cruzi*.

Reactivo	Concentración del stock	Concentración final	Vol./reacción (µL)
Agua destilada	-	-	10,25
Tampón5X (Tris-HCl 250 mM [pH 9,0], NaCl 250 mM).	5X	1X	5
Oligo 121	10 µM	1 µM	2,5
Oligo 122	10 µM	1 µM	2,5
MgCl ₂	50 mM	3 mM	1,5
dNTPs	5 mM	200 µM	1
Taq polimerasa	5 U/µL	0,05 U/µL	0,25
Muestra	-	-	2
Volumen final	-	-	25

Tabla 2. Programa de incubación y ciclos de PCR ADNk.

Temperatura (°C)	Tiempo (min.)	Ciclos
94	4	1
68	2	1
72	2	1
94	1	5
66	1	
72	1	
94	1	35
64	1	
72	1	
72	5	1
4	por siempre	1

Visualización de los productos de PCR ADNk: el amplicón de 330pb fue separado por electroforesis en geles de agarosa al 2% en Tampón TAE 0,5X (Tris-Acetato-EDTA) a 50V durante 1 hora. A continuación, para evidenciar los ácidos nucleicos se transfirió el gel a una cubeta con 500 mL de agua destilada, se añadieron 2 µl de bromuro de etidio (BrEt) y se dejó reposar durante 2 minutos. Finalmente los ácidos nucleicos se visualizaron en un transiluminador con luz ultravioleta (Gel Dock) y se realizó el registro fotográfico.

4.3. Uso de tripomastigotes aislados de la cavidad peritoneal de ratones para la preparación del inóculo de parásitos.

Evaluaciones previas llevadas a cabo en el Laboratorio de Inmunología y Quimioterapia del IBE, denotaron la presencia de tripomastigotes en la cavidad peritoneal (c.p.) de ratones infectados con estos aislados de *T. cruzi*, al mismo tiempo que los parásitos no podían ser detectados en sangre por un examen microscópico directo durante la fase aguda. Por ello nos propusimos estandarizar un método de aislamiento de los tripomastigotes de la cavidad peritoneal y utilizarlos como una fuente alternativa de parásitos para preparar los inóculos empleados en las infecciones experimentales.

De esta manera, con cada aislado de *T. cruzi*, YAGUA y MACH-1, se realizó el siguiente protocolo: un ratón con 21 a 30 días de infección fue sacrificado por sobredosis en cámara de cloroformo. Inmediatamente se llevó a cabo su disección, retirando la piel y dejando expuesta la cavidad abdominal, donde se realizó un pequeño corte en forma de ojal a fin de hacer un lavado intraperitoneal por este orificio. Para ello se utilizó una pipeta Pasteur instilando un volumen de 1 a 1,5 mL de solución salina (SS) (NaCl 0,85%) estéril dentro de la cavidad y se dio un ligero masaje. A continuación se extrajo el líquido intraperitoneal resultante y se colocó en uno o varios tubos Eppendorf. Para determinar la

concentración de tripomastigotes en la suspensión se realizó un conteo en la cámara de Neubauer© y finalmente se calculó el número de parásitos en la suspensión de acuerdo al volumen total obtenido.

4.4. Influencia del aislado de *T. cruzi* y la vía de infección sobre la respuesta parasitológica e inmunológica en ratones NMRI.

Se determinó el efecto de parámetros tales como, el aislado de *T. cruzi* y la vía de administración o puerta de entrada del parásito, sobre la respuesta inmunoparasitológica de los animales experimentales durante la fase aguda de la infección. Para ello fueron empleados 20 ratones distribuidos en 4 grupos de 5 ratones cada uno. Para preparar los distintos inóculos se utilizaron tripomastigotes provenientes de la cavidad peritoneal de ratones infectados previamente (ver apartado anterior 4.3).

Grupos experimentales:

- Inóculo $2,5 \times 10^3$ parásitos/ratón, vía intraperitoneal (ip):

Grupo A: aislado *T. cruzi* YAGUA

Grupo B: aislado *T. cruzi* MACH-1

- Inóculo $2,5 \times 10^3$ parásitos/ratón, vía oral:

Grupo C: aislado *T. cruzi* YAGUA

Grupo D: aislado *T. cruzi* MACH-1

4.4.1. Vía de infección intraperitoneal.

La vía de inoculación intraperitoneal es la más comúnmente empleada para infectar animales experimentales con *T. cruzi*. Para ello se empleó una jeringa de 1mL acoplada a una aguja 26 x 1^{1/2}, y se inyectó la cantidad correspondiente de parásitos dentro de la cavidad abdominal de cada ratón, contenida en 0,5mL de solución salina.

4.4.2. Vía de infección oral.

La administración de los tripomastigotes por vía oral fue llevada a cabo empleando una cánula oral acoplada a una jeringa de 1cc. Luego de inmovilizar al ratón sujetándolo con la mano, se le administró la suspensión de parásitos correspondiente contenida en 0,1 mL de SS gota a gota, colocando la punta de la cánula dentro de la cavidad bucal y procurando el contacto con la mucosa, permitiendo al animal tragar el líquido durante la administración.

4.5. Evaluación parasitológica de ratones infectados con los aislados durante la fase aguda de la infección.

Para llevar a cabo la evaluación parasitológica en cada grupo de ratones, se determinó la parasitemia (tripomastigotes/mL de sangre) y la cuantificación de tripomastigotes en la cavidad peritoneal (N° tripomastigotes/mL de líquido intraperitoneal) hasta los 46 días de infección. En aquellos ratones en los que no se detectaron parásitos por los métodos anteriores durante este período, se aplicó el hematocrito (prueba parasitológica de mayor sensibilidad).

4.5.1. Evolución de la parasitemia.

La evaluación de la parasitemia se llevó a cabo mediante el método de Brener (Brener y col., 2000). Se realizó durante la fase aguda de la infección, dos veces por semana a partir del día 7 de infección, hasta el día 46 post infección (p.i.). Este método nos permitió cuantificarla concentración de tripomastigotes presentes en la sangre de los ratones y los resultados fueron tabulados y graficados.

Brevemente: se recolectó sangre de la punta de la cola cortada del ratón mediante un capilar de 5 μ L acoplado a un dispositivo provisto de un bulbo. Esta sangre fue colocada sobre una lámina portaobjetos y cubierta con una laminilla de 22 x 22mm, formándose una mono capa de células. A continuación se determinó el número de parásitos presentes en 100 campos microscópicos empleando el objetivo de 40X. El número resultante de parásitos se multiplicó por el factor del microscopio (previamente calculado) para obtener el número de tripomastigotes/mL de sangre (parasitemia). La sensibilidad del método de Brener es de 2.000 a 20.000 parásitos/mL de sangre (Sanoja, 2001).

4.5.2. Cuantificación de tripomastigotes en la cavidad peritoneal.

Se determinó la concentración de tripomastigotes en la cavidad peritoneal, durante la fase aguda. Al igual que la parasitemia, esta evaluación se llevó a cabo 2 veces por semana a partir del día 7 hasta el día 46 post infección.

Para realizar el lavado intraperitoneal y obtener los tripomastigotes se procedió de la siguiente manera: con una inyectora de 1 mL acoplada a una aguja de 25 pulgadas x 1 1/2", se inyectó 1mL de solución salina estéril en la cavidad peritoneal de los ratones, luego de un ligero masaje en el abdomen se colectó el exudado en un tubo Eppendorf hasta obtener 500 μ L de líquido i. p. La suspensión resultante fue centrifugada a 12,6g por 5

minutos, en una centrifuga (Eppendorf Centrifuge 5415C) a temperatura ambiente. A continuación se retiraron 300µL del sobrenadante resultante y se resuspendió el sedimento en los 200µL restantes. El conteo de tripomastigotes se realizó en la cámara de Neubauer para determinar la concentración de parásitos. Los datos fueron tabulados y graficados.

Para evaluar la morfología de los tripomastigotes, la posible presencia de células parasitadas con amastigotes y células del sistema inmunológico, se obtuvo el exudado intraperitoneal de ratones infectados (21 a 35 d. p. i.) con los aislados empleados. Se prepararon extendidos, los cuales fueron fijados con metanol y coloreados con May Grünwald Giemsa. Se llevó a cabo el registro fotográfico.

4.5.3. Detección de tripomastigotes sanguíneos por el método del hematocrito.

Tal como se indicó anteriormente los ratones con parasitemia negativa o ausencia de parásitos en la cavidad peritoneal durante toda la fase aguda, fueron evaluados por este método. Para ello, mediante un microcapilar heparinizado se colectaron 70µL de sangre de la cola del ratón previamente cortada y se centrifugaron a 1.290g durante 10 minutos en una centrifuga de hematocrito (4223 Centrifuge) a temperatura ambiente. Posteriormente, se aisló la interfase entre el plasma y los eritrocitos, “buffy coat” y fue examinada en el microscopio óptico a 400X para detectar la posible presencia de tripomastigotes. La sensibilidad de este método es mayor o igual a 300 tripomastigotes/mL de sangre (Sanoja, 2001).

En aquellos ratones cuya evaluación parasitológica fue negativa tanto en sangre (por ambos métodos Brener y hematocrito) como en la cavidad abdominal, se llevó a cabo un ensayo de PCR ADNk para determinar la posible presencia de ADN de *T. cruzi* en sangre y corroborar la infección inicial (ver apartado 4.2).

4.6. Evaluación del tropismo cardíaco del aislado de *T. cruzi* YAGUA mediante métodos histológicos.

Otro grupo de 4 ratones fue infectado con $2,5 \times 10^3$ parásitos de *T. cruzi* YAGUA por vía intraperitoneal. Estos animales fueron empleados para evaluar el tropismo cardíaco del aislado (presencia de nidos de amastigotes) y detectar la posible reacción inflamatoria local infiltrado celular inflamatorio (ICI) en el tejido cardíaco. En este sentido, se procesaron histológicamente los corazones procedentes de ratones sacrificados a los 7, 14, 21 y 28 días p.i. (un ratón para cada día). Una vez preparadas las láminas con los cortes teñidos con Hematoxilina-Eosina (H&E), se observaron 100 campos microscópicos a 400X en cada corte de corazón (total 10 cortes) para detectar la presencia y variación en el número de nidos de amastigotes durante los días evaluados. Así mismo, se realizó una evaluación cualitativa de la intensidad del ICI. Corazones de ratones sanos fueron procesados como controles negativos. Se realizó un registro fotográfico de las observaciones microscópicas.

El día correspondiente cada ratón infectado fue sacrificado por sobredosis de cloroformo. Luego de su disección, el corazón fue extraído, cortado longitudinalmente en dos mitades iguales e inmediatamente colocado en formalina al 10% para su fijación, durante 7 días como mínimo a 4°C.

El procedimiento histológico llevado a cabo se describe a continuación: cada muestra (corazón) fue sometida a un proceso de deshidratación en una batería de alcoholes con concentraciones ascendentes (70% a 100%). Luego se procedió al aclaramiento en tolueno (2 cambios). Seguidamente la muestra fue incluida en parafina. Posteriormente se realizaron los cortes en un micrótopo (LEICA) en secciones de $5 \mu\text{m}$ de grosor, dejando $15 \mu\text{m}$ entre uno y otro, y se montaron en láminas portaobjetos. Los cortes fueron desparafinados y rehidratados en una batería de alcoholes de concentración descendiente

(100% a 50%) y finalmente en agua destilada y agua corriente. Fueron teñidos con Hematoxilina y Eosina, deshidratados y montados usando el medio de montaje permanente “Permout” (Fisher Scientific).

4.7. Respuesta inmunológica de anticuerpos IgM e IgG contra *T. cruzi* durante la fase aguda experimental.

Para cuantificar la respuesta de anticuerpos IgM e IgG específicos contra *Trypanosoma cruzi* durante la infección experimental aguda, se aplicó el inmunoensayo (ELISA). Para ello se tomaron muestras de sangre de los ratones durante la fase aguda a fin de obtener los sueros utilizados en estas pruebas.

4.7.1. Obtención de sueros sanguíneos.

Sueros de ratones de los diferentes grupos experimentales fueron obtenidos dos veces por semana a partir del día 0(día de la infección) hasta el día 46pi. Un ratón sano fue empleado para preparar el suero sanguíneo usado como control negativo de los ensayos. El suero anti-*T. cruzi*, control positivo, fue obtenido de un ratón con 36 días de infección en el que se había comprobado la presencia de tripomastigotes sanguíneos previamente.

Para obtener los sueros se procedió de la siguiente manera: una vez cortada la punta de la cola del ratón se extrajo un volumen de 200µL de sangre, se mantuvo a 37°C (estufa) durante 1 hora y luego a 4°C por 24 horas. Transcurrido este tiempo se retiró el suero usando una micropipeta. Fue centrifugado a 50,4g durante 10 minutos y el sobrenadante resultante fue centrifugado de nuevo en las mismas condiciones para eliminar los posibles eritrocitos presentes. Los sueros fueron almacenados a -20°C hasta su uso en los ensayos inmunológicos correspondientes.

4.7.2. Evaluación de anticuerpos IgM e IgG anti-*T. cruzi* mediante el Ensayo de Inmunoabsorción Ligado a Enzimas.

Para medir la respuesta de anticuerpos IgM e IgG contra antígenos de *T. cruzi* se empleó la técnica ELISA indirecta de acuerdo al protocolo habitual (Voller y col., 1975).

Placas de 96 de pocillos fueron sensibilizadas con un extracto total de epimastigotes de *T. cruzi* (1µg/pocillo) preparado previamente en la Sección de Inmunología del Instituto de Medicina Tropical, UCV y se dejaron reposar durante 24 horas a 37°C. Transcurrido este tiempo los sueros de los ratones sanos e infectados fueron incubados previa dilución 1:50 en solución de bloqueo (leche descremada 5%, Tween 20 0,05% en Buffer Fosfato Salino (PBS) pH 7,2) en cámara húmeda a 37°C durante 1 hora. Luego se realizaron 3 lavados con solución de lavado PBS pH 7,2. Para la detección del isotipo IgM en el suero, se empleó el anticuerpo secundario anti-IgM de ratón conjugado a Peroxidasa (HRP) (BioSource) en una dilución 1:3000 en solución de bloqueo. Para la detección del isotipo IgG se utilizó el anticuerpo secundario anti-IgG de ratón conjugado a Fosfatasa alcalina (ALP) (BioSource) en una dilución 1:1000. Se añadieron 50µl/pocillo en los respectivos pocillos y se incubó la placa en cámara húmeda a 37°C durante 1 hora. Posteriormente se realizaron 3 lavados con solución de lavado. Para revelar la reacción de IgM se agregaron 50µL de Trimetilbenzidina (TMB) previamente preparada ó de o-Phenylenediamine dihydrochloride (OPD) (10mg OPD; 10mL de buffer citrato-fosfato; 15µL de peróxido de hidrógeno), y la reacción de IgG se reveló con 50µL de Paranitrofenilfosfato (pNPP). Se permitió avanzar las reacciones colorimétricas (TMB y pNPP) durante 15 minutos a temperatura ambiente ó por 30 minutos (OPD). Para detener la reacción entre HRP/TMB se usó ácido sulfúrico 1N, HRP/OPD se empleó ácido clorhídrico 1N, y para ALP/pNPP se agregó hidróxido de

sodio, en todos los casos 50µL/pocillo. Se leyeron los resultados en un espectrofotómetro para placas de ELISA a 450nm (Peroxidasa) y 405 nm (fosfatasa alcalina).

4.8. Evaluación del efecto de inóculos más elevados administrados por vía oral.

Con cada aislado de *T. cruzi* YAGUA y MACH-1, se preparó un inóculo veinte veces mayor (50.000 tripomastigotes/ratón) con el objetivo de determinar una posible variación en el curso de la respuesta parasitológica. Cada grupo experimental estuvo conformado por 5 ratones en los que la parasitemia y la cinética de los tripomastigotes en la cavidad peritoneal fue evaluada con la misma periodicidad que en los experimentos anteriores (ver figura 10). No obstante, la determinación de anticuerpos IgM e IgG anti-*T. cruzi* en el suero solo se llevó a cabo en el grupo infectado con el aislado MACH-1 durante 46 días y 2 veces por semana a partir del día 7 post infección.

A fin de establecer si un incremento aun mayor de la cantidad de parásitos suministrada por vía oral era proporcional a la respuesta inmunoparasitológica, otro pequeño grupo de ratones fue infectado con inóculos 40, 80 y 160 veces mayor con respecto al inoculo inicial (2.500 par/ratón) del aislado MACH-1. Cada ratón fue infectado con la siguiente cantidad de parásitos contenidos en un volumen de 0,1 mL de solución salina: a) 100×10^3 (n=2); b) 200×10^3 (n=2); 400×10^3 (n=1). La parasitemia y cinética de los tripomastigotes en la c.p. fue llevada a cabo en los 5 ratones, así como la determinación de anticuerpos IgM e IgG anti-*T. cruzi* durante la fase aguda de la infección.

En estos experimentos, al igual que en los anteriores, los tripomastigotes para cada inóculo se obtuvieron de la cavidad abdominal de ratones previamente infectados (ver apartado 4.3) y se siguió el protocolo de administración oral (apartado 4.4.2).

La figura 10, muestra los días en que se realizó cada prueba parasitológica a los animales infectados.

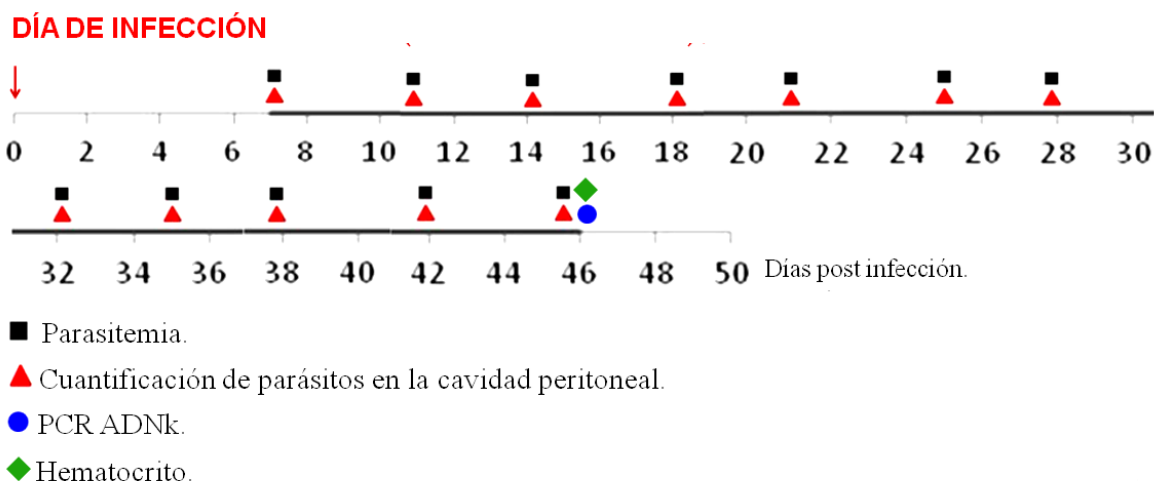


Figura 10. Evaluación parasitológica de los ratones infectados con los aislados de *T. cruzi* YAGUA y MACH-1 en el modelo murino durante la fase aguda de la infección.

4.9. Análisis estadístico.

Los datos de los ensayos serán expresados como la media $\pm$ error medio estándar (EMS) de los resultados obtenidos. Los datos serán analizados con el programa GraphPad Prism 5. Para comparar la media de los grupos utilizaremos la prueba ANOVA de una cola y el test de Kruskal-Wallis.

5. RESULTADOS

5.1. Diagnóstico molecular de tripanosomatideos provenientes de *Didelphis marsupialis* (aislado YAGUA) y *Panstrongylus* sp. (aislado MACH-1) en el taxón especie *Trypanosoma cruzi*.

Los resultados a la evaluación de las muestras por PCR ADNk se muestran en la figura 11 (carril 2 y 3). La amplificación del fragmento de 330 pb indica que ambos aislados pertenecen a la especie *Trypanosoma cruzi*. En la muestra procedente del ratón infectado con el aislado YAGUA (carril 2) se observan dos bandas, una de 330 pb correspondientes a una región variable del mini-círculo del kinetoplasto y otra de 550 pb. Las bandas menores a 100pb que se observaron en algunos carriles corresponden a los dímeros de los oligonucleótidos.

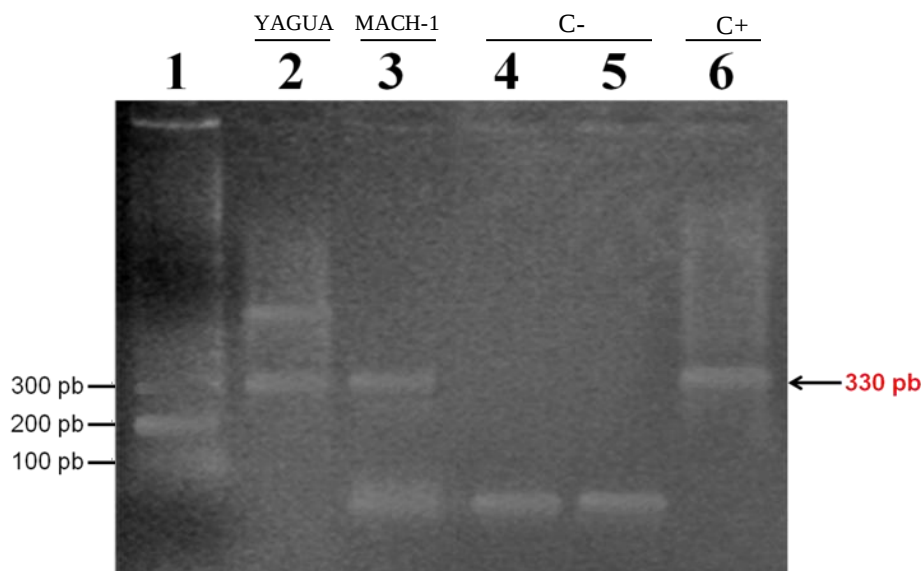


Figura 11. Diagnóstico molecular de los aislados YAGUA y MACH-1 en la especie *Trypanosoma cruzi* mediante PCR ADNk. Carril 1: Marcador de peso molecular 1kb plus (100pb); carril 2: muestra proveniente de ratón infectado con el aislado YAGUA; carril 3: muestra proveniente de ratón infectado con el aislado MACH-1; carriles 4 y 5: agua (controles negativos); carril 6: ADN de *T. cruzi* cepa CL Brener (control positivo). La flecha indica los 330 pb correspondientes a una región de la molécula de ADNk de *T. cruzi*.

5.2. Efectividad del empleo de tripomastigotes procedentes de la cavidad peritoneal de ratones experimentales.

Como se mencionó anteriormente, observaciones previas en el laboratorio de Inmunología y Quimioterapia indicaron que la parasitemia en los ratones infectados con los aislados del Dtto. Capital era escasa y de corta duración, lo cual dificultaba el empleo de tripomastigotes sanguíneos para llevar a cabo las infecciones experimentales. En este sentido, empleando la metodología propuesta en esta investigación (ver apartado 4.3) se obtuvieron parásitos suficientes de la cavidad peritoneal de ratones previamente infectados con los aislados de *T. cruzi* YAGUA y MACH-1, para preparar los diferentes inóculos que nos permitieron llevar a cabo los experimentos y determinar así el efecto de parámetros tales como tipo de aislado, tamaño de inóculo y vía de infección.

A continuación se muestra el estudio parasitológico de los ratones experimentales producto del éxito de la infección con los tripomastigotes de la cavidad peritoneal.

5.3. Evaluación parasitológica de ratones infectados por vía intraperitoneal con un inóculo de $2,5 \times 10^3$ parásitos de *T. cruzi* de los aislados YAGUA y MACH-1.

Una vez realizadas las inoculaciones con $2,5 \times 10^3$ parásitos/ratón por vía intraperitoneal, de los grupos A y B, aislado YAGUA y MACH-1, respectivamente, se evaluó el comportamiento parasitológico en los ratones desde el día 7 al 46 p.i. La sobrevivencia de los animales fue revisada diariamente, la parasitemia fue evaluada por el método de Brener (apartado 4.5.1) y la cinética de tripomastigotes en la cavidad abdominal se determinó mediante la metodología estandarizada en esta investigación (apartado 4.5.2).

Antes de comenzar la descripción de los resultados es importante indicar que si bien los animales de cada grupo fueron inoculados siguiendo la metodología descrita, en algunos

ratones no fue posible evidenciar la presencia de *T. cruzi* en **al menos una de las pruebas parasitológicas aplicadas, ni fragmentos de su ADNk por PCR**. Con esto se quiere indicar que si un ratón estuvo positivo a alguna de las pruebas, bien sea parasitológicas o molecular, se tomó en cuenta para la realización de las curvas de parasitemia y cinética de tripomastigotes en la cavidad abdominal, de lo contrario no.

5.3.1. Evolución de la sobrevivencia y parasitemia de los ratones infectados experimentalmente.

Cada grupo experimental (A y B) estuvo conformado inicialmente por 5 ratones. Al finalizar la evaluación parasitológica (46 días) se observó 80% de sobrevivencia para el grupo infectado con el aislado YAGUA y 100% de sobrevivencia en los ratones infectados con el aislado MACH-1.

En la figura 12 se muestra la curva de parasitemia de ambos aislados. En la evaluación de los ratones inoculados con el aislado *T. cruzi* YAGUA (grupo A) se detectó tripomastigotes en 40% de los animales (2/5). En uno de ellos se observaron características externas de la fase aguda tales como: pelo erizado, pérdida de peso y caída del tren posterior. Los tres ratones restantes del grupo estuvieron negativos en las pruebas parasitológicas y en la evaluación molecular, por lo que no se tomaron en cuenta para la elaboración de la curva de parasitemia. En la figura 12 se observa que a partir del día 21 p.i. hubo un aumento rápido de la parasitemia, presentándose un primer pico de parásitos a los 25 días post infección para luego disminuir progresivamente hasta casi desaparecer a los 32 d.p.i. A continuación se observaron dos picos más, alcanzándose un valor máximo de 58.212 parásitos/mL de sangre el día 36 post infección. Para el último día de evaluación los valores disminuyeron abruptamente (figura 12).

La curva de parasitemia obtenida para los ratones infectados con *T. cruzi* aislado MACH-1 (grupo B) se muestra en la figura 12. A diferencia del aislado YAGUA, todos los ratones de este grupo mostraron parásitos en sangre durante el tiempo de evaluación (5/5). Se observó un periodo prepatente menor que para el aislado YAGUA y a partir del día 14 p.i. la parasitemia aumentó progresivamente hasta un valor máximo a los 21 d.p.i. (12.701 par/mL de sangre) siendo este valor aproximadamente 5 veces menor con respecto al máximo alcanzado para el aislado YAGUA. La parasitemia fue disminuyendo progresivamente hasta el día 42 p.i. cuando no se detectaron parásitos, no obstante, la última evaluación a los 46 d.p.i. mostró una tendencia a un nuevo aumento (figura 12). En términos generales el promedio total de la parasitemia de los ratones infectados con el aislado *T. cruzi* MACH-1 fue menor que con el aislado *T. cruzi* YAGUA.

5.3.2. Estudio de la cinética de tripomastigotes en la cavidad peritoneal de los ratones infectados experimentalmente.

En la figura 13 se muestra la cinética de tripomastigotes intraperitoneales (media del número de parásitos/mL de exudado intraperitoneal $\pm$ error estándar x día vs tiempo). La cinética de *T. cruzi* en la c.p. de los ratones infectados por vía intraperitoneal con el aislado YAGUA (grupo A), demostró la presencia de tripomastigotes en 20% de los ratones (1/5). Para la elaboración de la curva se promediaron los valores de ese único ratón positivo con los de otro ratón, que aunque estuvo negativo durante esta evaluación, si presentó parásitos en sangre. La curva de la figura 13 para el aislado YAGUA muestra un aumento en la cantidad de tripomastigotes en la c.p. a partir del día 17 p.i. con un crecimiento exponencial, para alcanzar un valor máximo a los 25 d.p.i., seguido de una disminución abrupta del número de parásitos que se mantiene alrededor de los $10,9 \times 10^4$ parásitos/mL de líquido intraperitoneal durante el resto de la evaluación.

Al comparar la curva de cinética (figura 13) con la de parasitemia (figura 12) para este aislado se observó que la cantidad de tripomastigotes (concentración) en la c.p. llegó a ser casi 70 veces mayor que el valor máximo de parasitemia. Cabe recordar que se inyectó 1 ml de solución salina en la cavidad abdominal y se obtuvieron 0,5mL de exudado.

Por otra parte, la figura 13 también muestra la cinética de tripomastigotes intraperitoneales en los ratones infectados con *T. cruzi* aislado MACH-1. En este grupo (B), se evidenciaron parásitos en la cavidad peritoneal de todos los ratones inoculados (5/5) durante la evaluación. La detección de los tripomastigotes fue más temprana que con el aislado YAGUA, mostrando un incremento progresivo a partir del día 10 p.i. y alcanzando un valor máximo a los 17 d.p.i. Este pico fue aproximadamente 9 veces más bajo que el valor máximo obtenido con el aislado YAGUA. A continuación el número de tripomastigotes fue disminuyendo paulatinamente hasta el día 25 p.i. y finalmente a los 46 d.p.i. no se detectaron parásitos en el exudado peritoneal a diferencia de la persistencia de los parásitos en sangre en esos ratones (figura 12). En términos generales la cinética mostró una tendencia similar a la parasitemia pero con valores más elevados en este grupo.

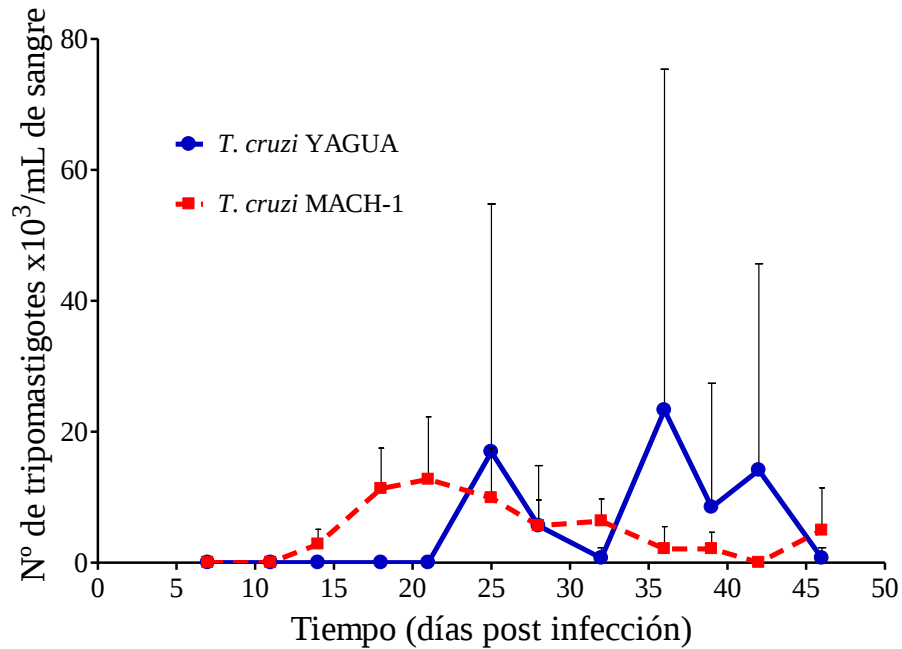


Figura 12. Evolución de la parasitemia de ratones infectados con $2,5 \times 10^3$ par /ratón por vía intraperitoneal con los aislados de *T. cruzi* aislado YAGUA(n=2) y *T. cruzi* aislado MACH-1 (n=5).

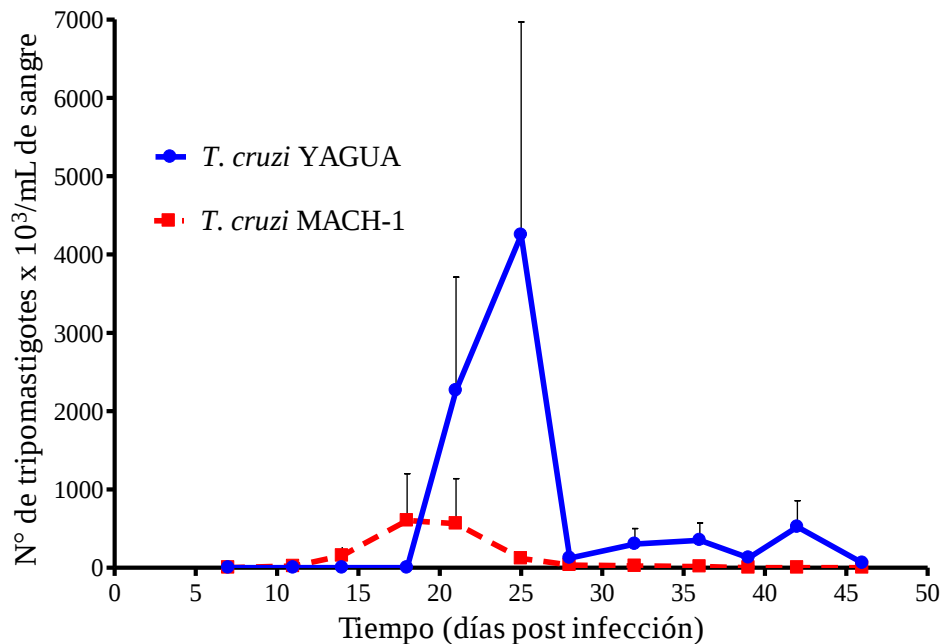


Figura 13. Cinética de tripomastigotes en la cavidad peritoneal de ratones infectados con $2,5 \times 10^3$ parásitos/ratón por vía intraperitoneal, con los aislados de *T. cruzi*, aislado YAGUA (n=2) y aislado MACH-1 (n=5).

En aquellos ratones de los grupos A y B que durante toda la evaluación (7 hasta 46 d.p.i.) mostraron ausencia de parasitemia y de tripomastigotes en la cavidad peritoneal se realizó el hematocrito, una prueba parasitológica de mayor sensibilidad que el método de Brener, para evidenciar posibles tripomastigotes sanguíneos. Todos los ratones evaluados (2 en total) fueron negativos al hematocrito (Tablas 3 y 4). En vista de este último resultado se llevó a cabo el diagnóstico molecular por PCR de la sangre de estos ratones aparentemente no infectados (ver más adelante apartado 5.6.).

5.4. Estudio microscópico del exudado de la cavidad peritoneal de los ratones infectados. Morfología de los tripomastigotes intraperitoneales.

Muestras del exudado intraperitoneal de ratones infectados fueron fijadas con metanol y teñidas con la coloración MGG. En las figuras 14 y 15 se observan tripomastigotes intraperitoneales correspondientes a los aislados de *T. cruzi* YAGUA y MACH-1, respectivamente. Los tripomastigotes presentan la forma típica de “C” y “S” de *T. cruzi* y la tinción permitió evidenciar el kinetoplasto (k), el núcleo (n) en posición anterior, y el flagelo libre (f) en la región posterior (figura 15A-C). En el exudado peritoneal se observaron formas alargadas (figura 14B) al inicio de la fase aguda (primera semana de infección) y posteriormente se evidenciaron formas rechonchas predominantemente (figura 14A). Abundantes linfocitos (l) y polimorfonucleares también fueron observados (figuras 14 y 15).

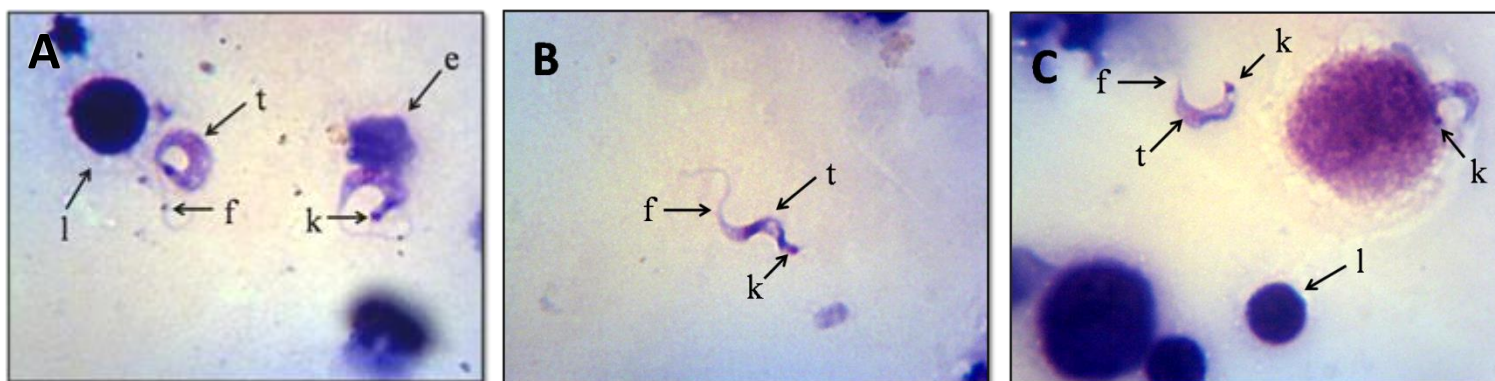


Figura 14. Evaluación microscópica del exudado peritoneal de ratones infectados con *Trypanosoma cruzi* aislado YAGUA. Se observan tripomastigotes (t) con su kinetoplasto (k), y flagelo libre (f), algunos eritrocitos (e). Presencia de células del sistema inmunológico: linfocitos (l). Coloración May Gründwald Giemsa. Aumento 1000X.

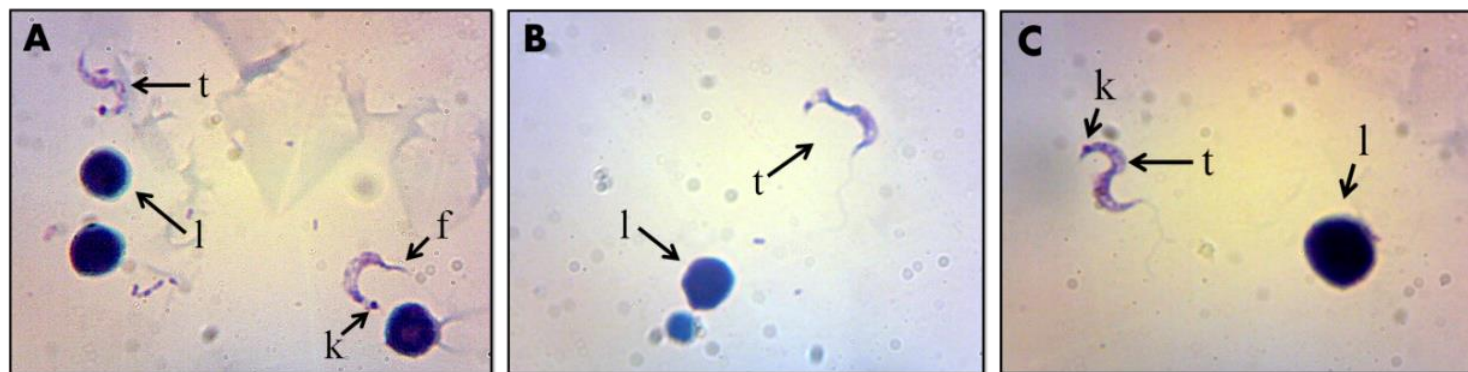


Figura 15. Evaluación microscópica del exudado peritoneal de ratones infectados con *Trypanosoma cruzi* aislado MACH-1. Se observan tripomastigotes (t) con su kinetoplasto (k), y flagelo libre (f). Presencia de células del sistema inmunológico: linfocitos (l). Coloración May Gründwald Giemsa. Aumento 1000X.

En el exudado peritoneal de ratones infectados con el aislado MACH-1 se detectaron macrófagos infectados con *T. cruzi*. No obstante la observación de estas células parasitadas no fue muy frecuente. La figura 16 muestra un macrófago con amastigotes intracelulares.

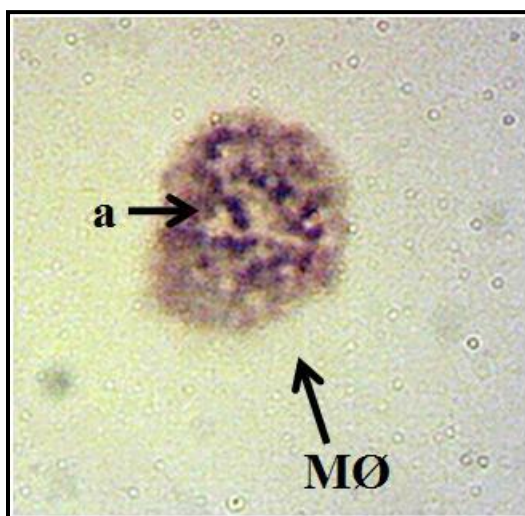


Figura 16. Macrófago con amastigotes intracelulares obtenidos del líquido intraperitoneal de ratones infectados con *T. cruzi* aislado MACH-1. Se observan los amastigotes (a) en el citoplasma del macrófago (MØ) y el kinetoplasto de los amastigotes. Coloración May Grönwald Giemsa. Aumento 1000X.

5.5. Evaluación de la infectividad de tripomastigotes intraperitoneales administrados por vía oral en el modelo murino.

Tras realizar la infección oral de los ratones con los inóculos establecidos de los aislados YAGUA y MACH-1, estudiamos el comportamiento parasitológico desde el día 7 al 46 p.i. Se evaluó diariamente la sobrevivencia de los animales, la parasitemia y cinética de tripomastigotes en la cavidad peritoneal al igual que en experimentos previos.

5.5.1. Evaluación parasitológica de ratones infectados por vía oral con un inóculo de $2,5 \times 10^3$ parásitos de *T. cruzi* de los aislados YAGUA y MACH-1.

Cada grupo experimental (C y D) estuvo conformado por 5 ratones. Al finalizar la evaluación se observó sobrevivencia del 100%, en ambos grupos.

La evaluación de la parasitemia en los ratones infectados por vía oral con el aislado *T. cruzi* YAGUA (n=5), no mostró evidencia de tripomastigotes durante el tiempo estudiado. Así mismo en la evaluación realizada a los ratones infectados por vía oral con el aislado *T. cruzi* MACH-1, tampoco se detectaron tripomastigotes. En la evaluación de la cavidad peritoneal de ambos grupos de ratones no se detectaron tripomastigotes. Todos los ratones evaluados (10 en total) fueron negativos al hematocrito (Tablas 3 y 4).

Las pruebas moleculares que se realizaron después de los 46 d.p.i. a ambos grupos de ratones (C y D), evidenciaron la ausencia de ADNk de *T. cruzi* en las muestras de sangre de estos animales (ver más adelante figuras 23 y 25).

5.5.2. Evaluación parasitológica de ratones infectados por vía oral empleando inóculos más elevados de ambos aislados de *T. cruzi*.

Debido a que con el inóculo ensayado al inicio de la investigación ($2,5 \times 10^3$) no se observó parasitemia en los ratones infectados por vía oral, se empleó un inóculo 20 veces mayor (50×10^3 parásitos/ratón) para determinar la infectividad de los aislados por esta vía de administración. Igualmente se evaluó el comportamiento parasitológico de cada aislado de *T. cruzi* desde el día 7 hasta el 46 p.i., determinando la sobrevivencia, parasitemia y cinética de los tripomastigotes intraperitoneales en los ratones infectados.

Al finalizar el estudio se observó 100% de sobrevivencia en el grupo infectado con el aislado *T. cruzi* YAGUA (n=5) y 50% de sobrevivencia en el grupo de ratones infectados con el aislado *T. cruzi* MACH-1 (n=2) (Tabla 3 y 4).

La parasitemia en el grupo infectado con el aislado YAGUA (n=5) fue detectada en un solo ratón a los 25 d.p.i. con un valor de 882 parásitos/mL de sangre (figura no mostrada). En el resto de los ratones no se observaron parásitos en sangre durante el estudio. En este mismo ratón se detectaron tripomastigotes en la cavidad peritoneal, mientras que en los otros cuatro no se observaron. Posteriormente, la prueba de hematocrito dio resultados negativos en estos cuatro animales evaluados. Por lo contrario, el diagnóstico molecular por PCR detectó la banda de 330 pb en tres de ellos (ver más adelante apartado 5.6., figura 24). Por esta razón y de acuerdo al criterio establecido anteriormente, se tomaron en cuenta los datos de esos tres animales para graficar la curva (figura 17). En este sentido, la cinética mostró un aumento en la cantidad de parásitos desde el día 28 hasta el 32 p.i. cuando alcanza un valor máximo de 7.060 parásitos/mL en el líquido intraperitoneal, para luego disminuir de manera progresiva hasta su desaparición a los 42 días p.i.

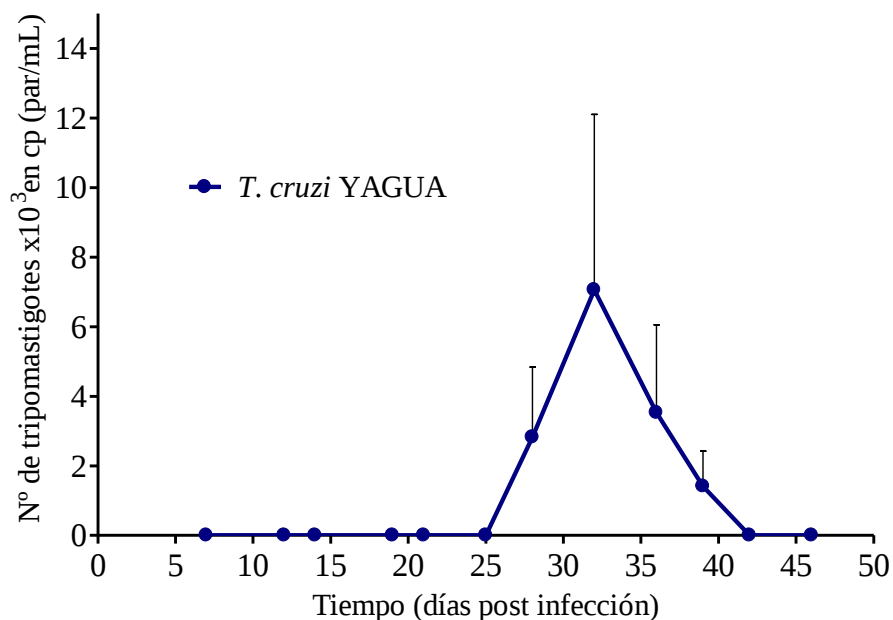


Figura 17. Cinética de tripomastigotes en la cavidad peritoneal de ratones infectados con 50×10^3 tripomastigotes de *T. cruzi* aislado YAGUA por vía oral (n=5).

Por otra parte, uno de los dos ratones infectados con *T. cruzi* aislado MACH-1 mostró parásitos, tanto en sangre como en la cavidad abdominal (figuras 18 y 19). Sin embargo, la PCR evidenció ADNk de *T. cruzi* en la muestra de sangre del ratón parasitológicamente negativo (ver más adelante figura 29). La figura 18 muestra la curva de parasitemia de este grupo experimental. Se observó un incremento exponencial a partir del día 11 p.i., alcanzando un valor máximo a los 25 d.p.i. al igual que con el aislado YAGUA, aunque más elevado (56.448 par/mL). El número de tripomastigotes en sangre fue disminuyendo a partir de allí y a los 30 d.p.i. ocurrió la muerte del ratón positivo. En el ratón sobreviviente no se detectaron tripomastigotes sanguíneos en los días restantes de evaluación (figura 18).

La cinética de tripomastigotes intraperitoneales se muestra en la figura 19. A partir del día 12 p.i se observa un rápido incremento del número de parásitos en la c.p., alcanzando un valor máximo (462.500 par/mL) el día 18 p.i. para luego disminuir

progresivamente. El período prepatente fue menor con respecto al aislado YAGUA en las mismas condiciones experimentales, y el pico de tripomastigotes fue casi 66 veces mayor. Cabe destacar que este comportamiento es contrario a lo que ocurre cuando la infección es por vía intraperitoneal, donde el aislado YAGUA produjo mayor número de parásitos en la cavidad abdominal.

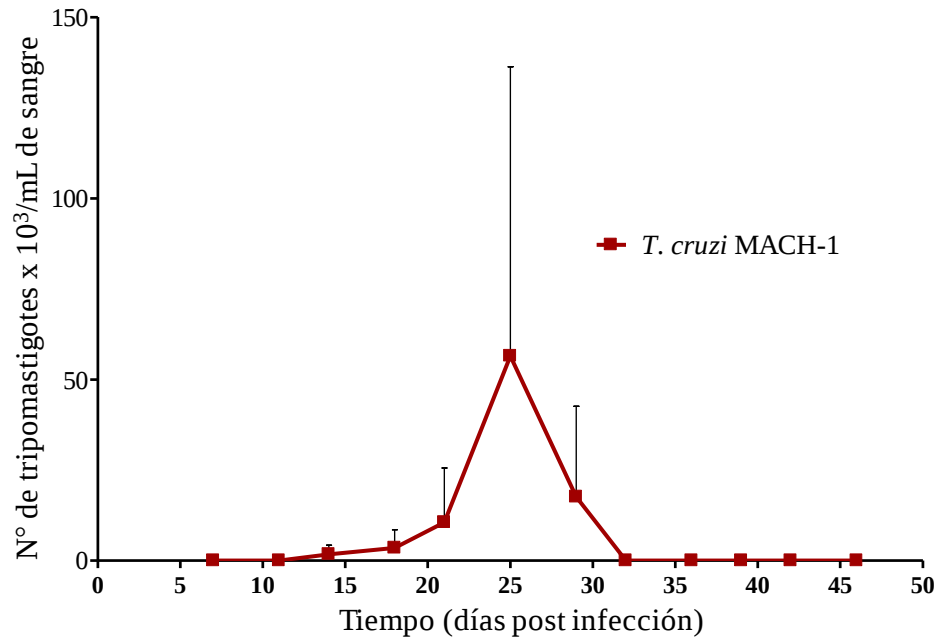


Figura 18: Evolución de la parasitemia del grupo de ratones infectados con 50×10^3 parásito/ratón de *T. cruzi* aislado MACH-1 por vía oral (n=2).

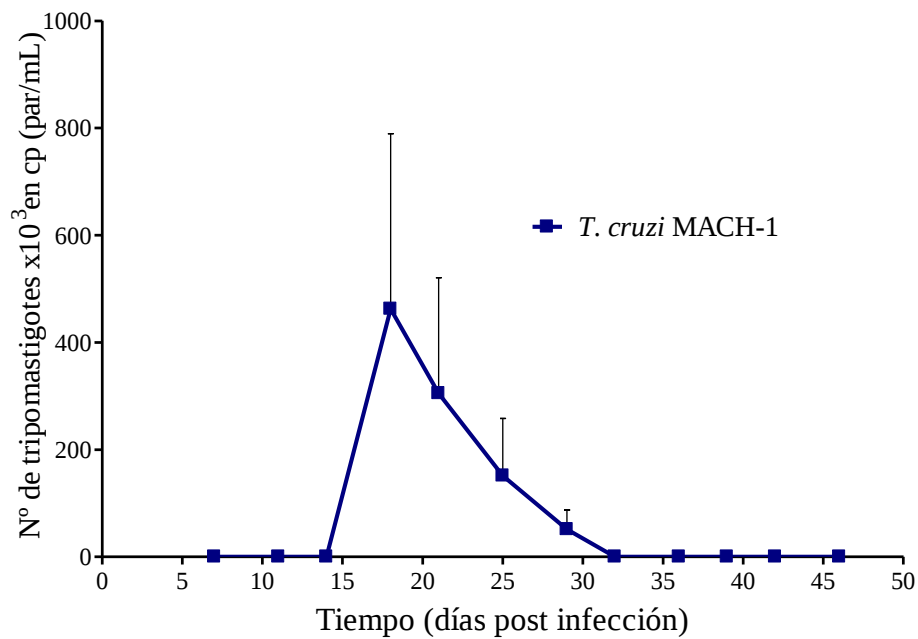


Figura 19. Cinética de tripomastigotes en la cavidad peritoneal de ratones infectados con 50×10^3 parásito /ratón de *T. cruzi* aislado MACH-1 por vía oral (n=2).

5.5.3. Variación de la respuesta parasitológica tras un incremento exponencial del inóculo de *T. cruzi* aislado MACH-1 en la infección oral.

Se llevó a cabo un estudio preliminar para determinar el efecto en la respuesta parasitológica como resultado de un aumento exponencial en el tamaño del inóculo en las infecciones orales. En las figuras 20 y 21 se muestran las curvas de parasitemia y cinética de tripomastigotes intraperitoneales respectivamente, de los distintos grupos experimentales.

En la figura 20 se observa la curva de parasitemia del grupo de ratones infectados con 100×10^3 parásitos/ratón ($n=2$) no se detectaron tripomastigotes sanguíneos durante el período de evaluación. Sin embargo las pruebas moleculares (ver apartado 5.6) permitieron detectar la banda correspondiente al ADNk de *T. cruzi*.

La curva de parasitemia del grupo de ratones infectados con 200×10^3 parásitos/ratón ($n=2$) mostró un aumento a partir del día 25 hasta el día 32 p.i. cuando alcanzó el valor máximo (26.460 par/mL de sangre). Posteriormente disminuyó abruptamente el día 36 p.i. y paulatinamente fue declinando hasta desaparecer a los 46 días de infección. Ambos ratones infectados mostraron parasitemia.

A un solo ratón se le administró un inóculo de 400×10^3 parásitos. En la curva de parasitemia se observa un período prepatente de 11 días y dos picos bajos de parasitemia a los 14 y 28 d.p.i. previos al valor máximo (17.640 par/mL de sangre) a los 42 d.p.i.

La cinética de tripomastigotes en la cavidad peritoneal de los distintos grupos de ratones se muestra en la figura 21. En los ratones infectados con el inóculo de 100×10^3 parásitos/ratón no se evidenciaron tripomastigotes en la cavidad peritoneal, mientras que con el inóculo de 200×10^3 parásitos/ratón ambos ratones mostraron tripomastigotes en la cavidad peritoneal. Se observaron respuestas muy distintas entre los

ratones de este grupo ya que en uno solo de ellos detectaron tripomastigotes el último día de evaluación (46 d.p.i.) mientras que en el otro a partir del día 25 p.i. se evidenciaron cantidades variables de parásitos, con una tendencia al aumento hacia el final de la evaluación. El número de parásitos en la c.p. fue menor que la parasitemia para este grupo.

En la figura 21 se observan los resultados de esta evaluación con 400×10^3 parásitos. Similar a lo que ocurrió en los ensayos anteriores el número de tripomastigotes obtenidos de la cavidad peritoneal fue mayor que la parasitemia. El número de tripomastigotes intraperitoneales incrementó a partir del día 21 p.i., con un primer pico a los 28 días y otro a los 36 p.i. (320.000 par/mL de líquido intraperitoneal) para luego disminuir progresivamente. En general con estos dos inóculos del mismo aislado de *T. cruzi* MACH-1, se observaron variaciones marcadas a lo largo de la evaluación en la cinética. De acuerdo al análisis estadístico (ANOVA, 1 cola), al aumentar el inóculo oral no se observaron diferencias significativas en el comportamiento parasitológico.

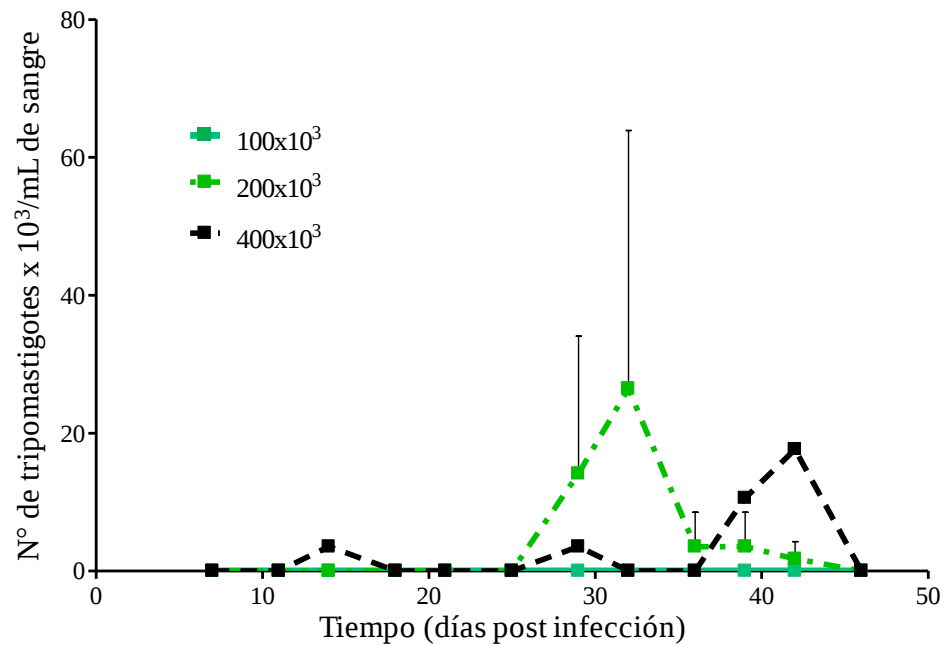


Figura 20: Evolución de la parasitemia de cuatro grupos de ratones infectados con el aislado MACH-1 de *Trypanosoma cruzi* con diferentes inóculos por vía oral.

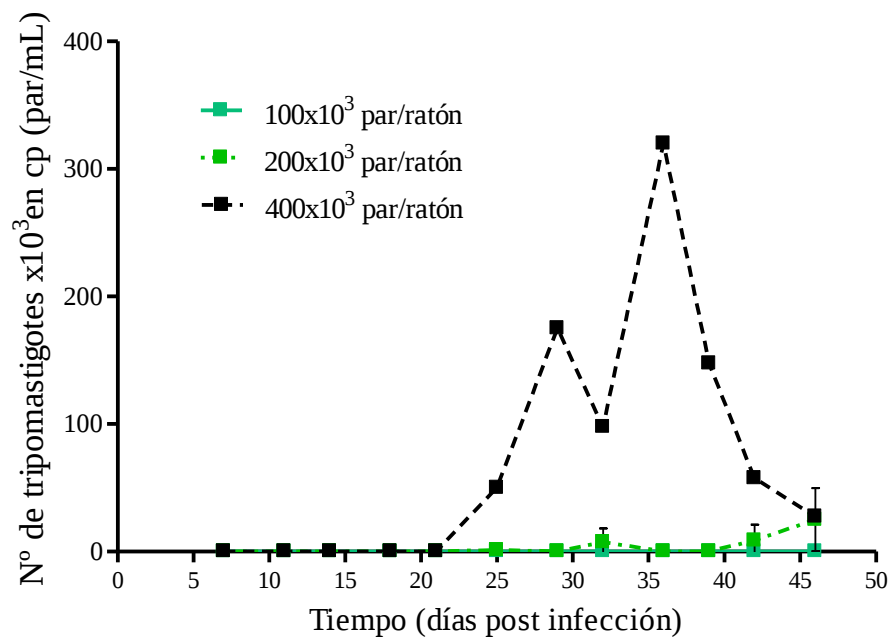


Figura 21. Cinética de tripomastigotes en la cavidad peritoneal de ratones infectados por vía oral, con diferentes inóculos del aislado MACH-1 de *Trypanosoma cruzi*.

5.6. Estudio del cardiotropismo del aislado *T. cruzi* YAGUA

Se llevó a cabo la evaluación histopatológica del corazón de ratones infectados con el aislado *T. cruzi* YAGUA a los 7, 14, 21 y 28 días post infección. No se detectaron nidos de amastigotes en los cortes a los 7 y 14 d.p.i., teniendo el aspecto de un tejido cardíaco sano comparable al mostrado en la figura 22A. Con el progreso de la fase aguda, se evidenciaron nidos de amastigotes en el interior de las fibras cardíacas a los 28 d.p.i. como lo muestran las figuras 22B y 22C. No se observó infiltrado celular inflamatorio alrededor de las fibras cardíacas parasitadas, ni en el resto del tejido.

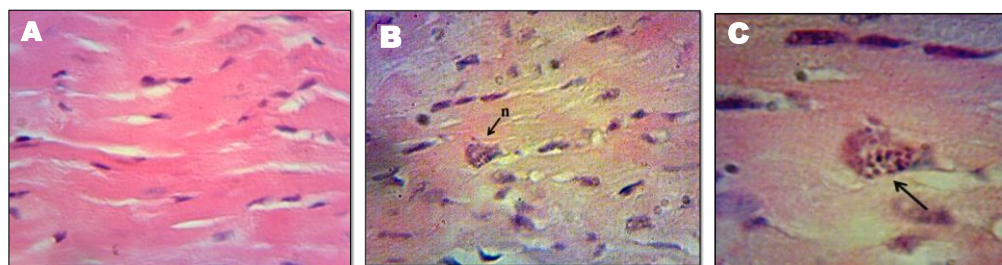


Figura 22. Evaluación histológica del tejido cardíaco de ratones infectados con el aislado YAGUA. A. Ratón control (sano), aumento 400X. B. Ratón infectado (28 d.p.i.), se muestra un nido de amastigotes y ausencia de ICIC, aumento 400X. C. Detalle del nido de amastigotes, aumento 1000X. La flecha señala el nido de amastigotes. Coloración H&E.

A continuación se muestran dos tablas que resumen los resultados de evaluación parasitológica de diferentes grupos experimentales. Así mismo, los resultados de la prueba molecular (PCR ADNk) que se realizó en ratones cuyo diagnóstico parasitológico fue negativo. En base a ambas pruebas, calculamos el porcentaje de infección con los diferentes aislados e inóculos empleados.

Tabla 3. Resultados de la evaluación parasitológica y molecular del aislado YAGUA de *T. cruzi*.

Vía de infección	Inóculo (Nºparx10 ³ /ratón)	EVALUACIÓN PARASITOLÓGICA					EVALUACIÓN MOLECULAR	Porcentaje de infección (%)
		Sobrevivencia	Parasitemia	Cavidad peritoneal	Hematocrito	(Positivos a pruebas parasitológicas/ Sobrevivientes)	PCR ADNk*	
ip	2,5	80%†	2/5	1/5	0/2	2/4	0/2	40
Oral	2,5	100%	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0
	50	100%	1/5	1/5	0/4	1/5	3/4	80

La fracción indica: Nº de ratones positivos/Nº de ratones evaluados en cada ensayo.

*: Se evaluaron por PCR ADNk los ratones que resultaron negativos a las pruebas parasitológicas.

% de Infección: basado en los resultados de la evaluación parasitológica y molecular.

ND: No determinado.

†: 1 muerto a los 12 d.p.i.

Tabla 4. Evaluación parasitológica y molecular del aislado MACH-1 de *T. cruzi*.

Vía de infección	Inóculo (Nºparx10 ³ /ratón)	EVALUACIÓN PARASITOLÓGICA					EVALUACIÓN MOLECULAR	Porcentaje de infección (%)
		Sobrevivencia	Parasitemia	Cavidad peritoneal	Hematocrito	(Positivos a pruebas parasitológicas/ Sobrevivientes)	PCR ADNk*	
ip	2,5	100%	5/5	5/5	ND	5/5	ND	100
Oral	2,5	100%	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0
	50	50%†	1/2	1/2	0/1	1/2	1/1	100
	100	100%	0/2	0/2	0/2	0/2	2/2	100
	200	100%	1/2	2/2	ND	2/2	ND	100
	400	100%	1/1	1/1	ND	1/1	ND	100

La fracción indica: N° de ratones positivos/N° de ratones evaluados en cada ensayo.

*: Se evaluaron por PCR ADNk los ratones que resultaron negativos a las pruebas parasitológicas.

% de Infección: basado en los resultados de la evaluación parasitológica y molecular.

ND: No determinado.

†: 1 muerto a los 30 d.p.i.

5.7. Diagnóstico molecular de la infección chagásica experimental mediante PCR ADNk en ratones negativos a las pruebas parasitológicas.

Finalizadas las evaluaciones parasitológicas se realizó el análisis molecular mediante PCR ADNk de las muestras de sangre extraídas de ratones que resultaron negativos a parásitos durante los 46 días de revisión, a fin de determinar la presencia de ADN de *T. cruzi*.

En la figura 23 se muestran los resultados obtenidos al evaluar la sangre de los animales infectados con *T. cruzi* “YAGUA”, inóculo 2.500 parásitos/ratón administrados por vía intraperitoneal (2 ratones: carril 4 y 5) y por vía oral (5 ratones: carril 6 al 10). Como se observa en la figura 23 todos resultaron negativos al ensayo molecular, confirmando los resultados de las pruebas parasitológicas aplicadas.

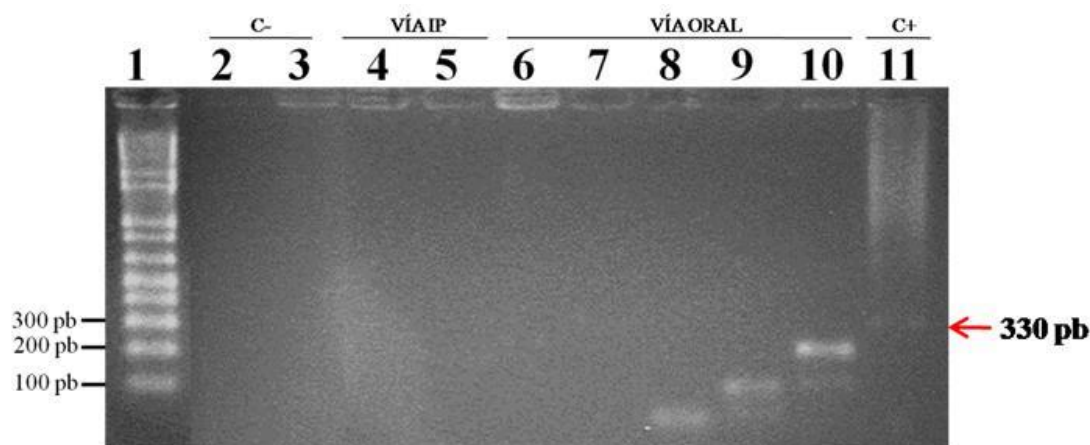


Figura 23. Diagnóstico molecular de la infección con *T. cruzi* mediante PCR ADNk de ratones inoculados con $2,5 \times 10^3$ tripomastigotes del aislado YAGUA negativos a las pruebas parasitológicas. Carril 1: marcador de peso molecular 1kb plus (100pb), carriles 2 y 3: agua (controles negativos), carriles 4 y 5: muestras de sangre de ratones infectados por vía intraperitoneal, carriles 6-10: muestras de sangre de ratones infectados por vía oral, carril 11: ADN de *T. cruzi* cepa 196 Tc1 (control positivo). La flecha indica los 330 pb correspondientes a una región de la molécula de ADNk de *T. cruzi*.

La figura 24 muestra los resultados obtenidos al evaluar molecularmente cuatro ratones del grupo inoculado por vía oral con 50×10^3 parásitos/ratón del aislado *T. cruzi* “YAGUA”, es decir un inóculo veinte veces mayor que el anterior. El ensayo demostró la presencia de ADNk de *T. cruzi* (banda 330pb) en 75%, de las muestras evaluadas (carriles 2, 3, 4), indicando la infección en tres ratones parasitológicamente negativos. (ver Tabla 3).

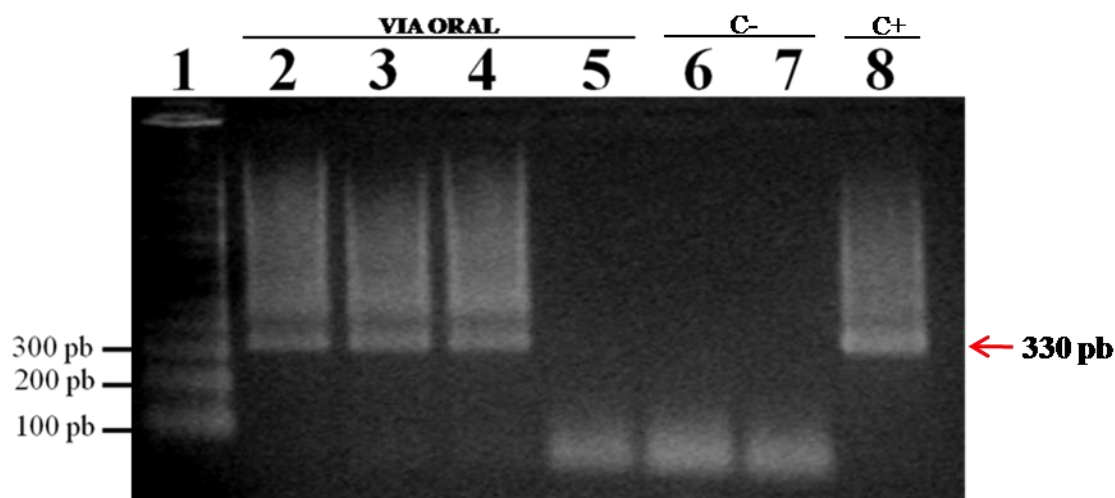


Figura 24. Diagnóstico molecular de la infección con *T. cruzi* aislado YAGUA mediante PCR ADNk de ratones inoculados con 50×10^3 parásitos, vía oral y negativos a las pruebas parasitológicas. Carril 1: marcador de peso molecular 1kb plus (100pb), carriles 2-5: muestras de sangre de ratones infectados, carriles 6 y 7: agua (controles negativos), carril 8: ADN de *T. cruzi* cepa CL Brener (control positivo). La flecha indica los 330 pb correspondientes a una región de la molécula de ADNk de *T. cruzi*.

El ensayo de PCR ADNk de las muestras de sangre de los ratones infectados con *T. cruzi* “MACH-1”, inóculo 2.500 parásitos/ratón por vía oral se muestra en la figura 25 (carriles 2 al 6). Todos los ratones evaluados fueron negativos al ensayo molecular (5/5), confirmando los resultados de las pruebas parasitológicas aplicadas que indicaron ausencia de infección en las condiciones indicadas. En el carril 6 se observa una banda de tamaño menor que la banda de interés de 330pb.

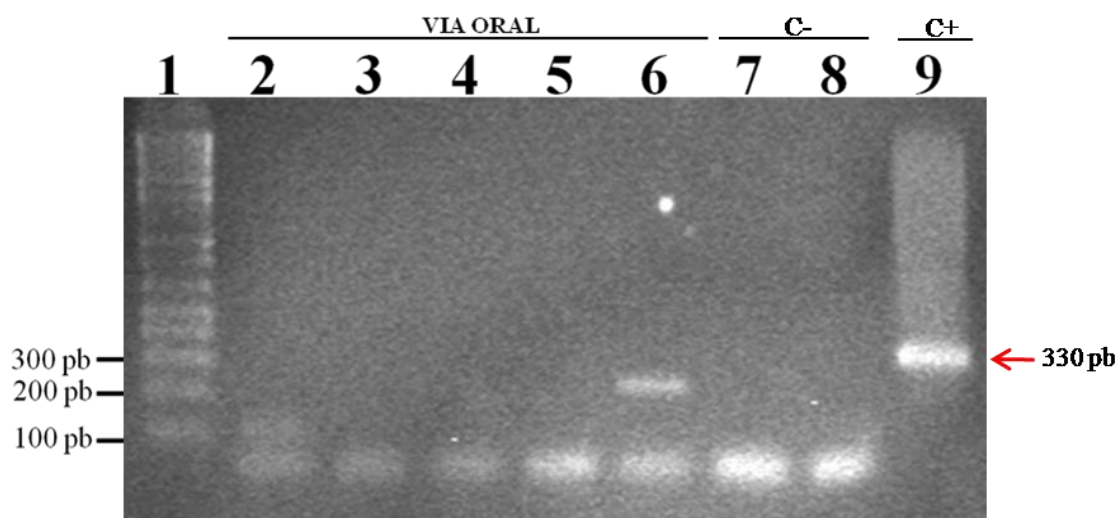


Figura 25. Diagnóstico molecular mediante PCR ADNk de la infección con *T. cruzi* aislado MACH-1 en ratones inoculados con $2,5 \times 10^3$ parásitos por vía oral. Carril 1: marcador de peso molecular 1kb plus (100pb), carriles 2-6: muestras de sangre de ratones infectados por vía oral, carriles 7 y 8: agua (controles negativos), carril 9: ADN de *T. cruzi* cepa CL Brener (control positivo). La flecha indica los 330 pb correspondientes a una región de la molécula de ADNk de *T. cruzi*.

En la figura 26 se muestra la evaluación molecular de las muestras de sangre de ratones infectados con *T. cruzi* “MACH-1”, inoculados por vía oral con cantidades crecientes de tripomastigotes. El carril 2 corresponde a la muestra del ratón inoculado con 50×10^3 parásitos y los carriles 3 y 4 la muestra de los inoculados con 100×10^3 parásitos/ratón. En las tres muestras evaluadas se observa la amplificación de la banda de 330pb, demostrando la infección por *T. cruzi* por vía oral al aumentar el inóculo en 100% de los animales (ver Tabla 4).

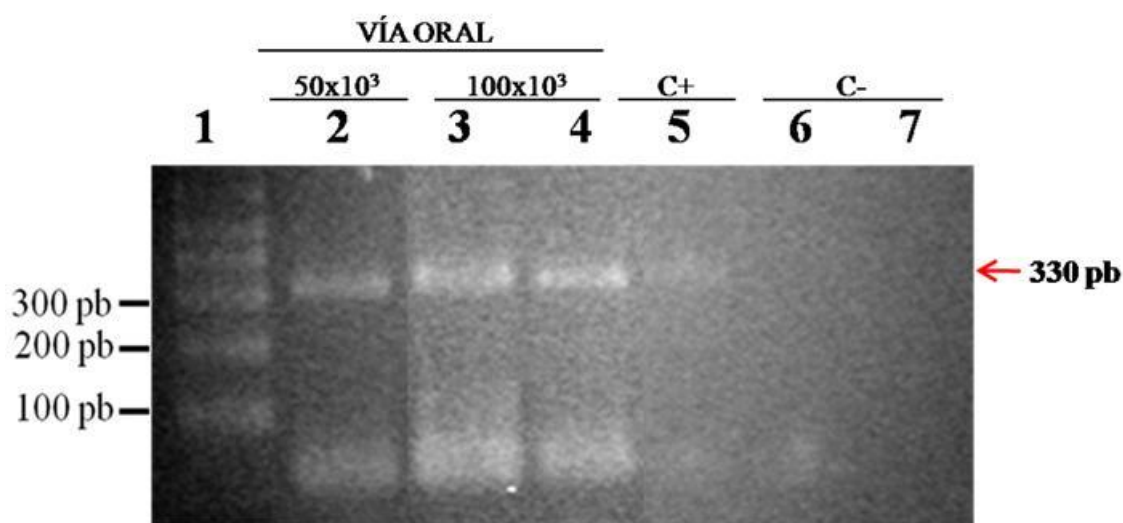


Figura 26. Diagnóstico molecular de la infección con *T. cruzi* aislado MACH-1 mediante PCR ADNk de ratones infectados con inóculos más elevados por vía oral. Carril 1: marcador de peso molecular 1kb plus (100pb); carril 2: muestra de sangre de ratone infectado con 50×10^3 ; carriles 3 y 4: muestras de sangre de ratones infectados con 100×10^3 ; carril 5: ADN de *T. cruzi* cepa 196 Tc1 (control positivo), carriles 6 y 7: agua (controles negativos). La flecha indica los 330 pb correspondientes a una región de la molécula de ADNk de *T. cruzi*.

5.8. Respuesta inmune humoral de los ratones infectados experimentalmente con los aislados de *T. cruzi*.

La evaluación de los anticuerpos del tipo IgM e IgG contra *T. cruzi* presentes en el suero de ratones infectados en diferentes condiciones con los aislados del parásito, se llevó a cabo mediante el ensayo ELISA. Para esta prueba se emplearon los sueros de todos los ratones infectados para determinar una posible respuesta inmunológica inicial que podría haber conllevado a la cura parasitológica de algunos animales que resultaron negativos en las pruebas parasitológicas y moleculares. Las curvas representan la media de la densidad óptica (DO) por día de evaluación. Se realizaron gráficos de dispersión indicando el valor obtenido para cada ratón (ver más adelante figura 31).

5.8.1 Comparación de la respuesta inmune humoral de ratones infectados por vía intraperitoneal con $2,5 \times 10^3$ tripomastigotes de *T. cruzi*: aislados YAGUA y MACH-1.

En las gráficas se representa la densidad óptica (proporcional al título de Ac) vs tiempo de infección. El punto de corte se realizó con seis sueros de ratones sanos como: tres veces la desviación estándar mas el promedio de los sueros. En la figura 27 se muestran los resultados obtenidos para la evaluación de la respuesta humoral del tipo IgM de ratones infectados con los aislados de *T. cruzi* YAGUA y MACH-1. Se observa que los valores de IgM aumentaron progresivamente conforme transcurrió la infección en ambos grupos y desde el primer día de evaluación (7 d.p.i.) ambos presentan valores muy por encima de la línea de corte. En los ratones infectados con el aislado MACH-1 este incremento fue exponencial a partir del día 14 p.i. hasta el día 25 p.i. cuando comenzó a declinar progresivamente. Con el aislado YAGUA el incremento fue moderado pero constante hasta

el día 42 p.i., cuando alcanzó un valor máximo similar al del aislado MACH-1 y luego al igual que este, comenzó a disminuir.

El análisis de la respuesta de anticuerpos IgG contra *T. cruzi* en estos mismos sueros se muestra en la figura 28. A partir del día 25 y 28 p.i. para MACH-1 y YAGUA respectivamente, se observó la seropositividad de los ratones. En ambos casos se observó un incremento exponencial en las curvas hasta el último día de evaluación, pero fue mayor la respuesta detectada en los sueros de los ratones infectados con el aislado MACH-1.

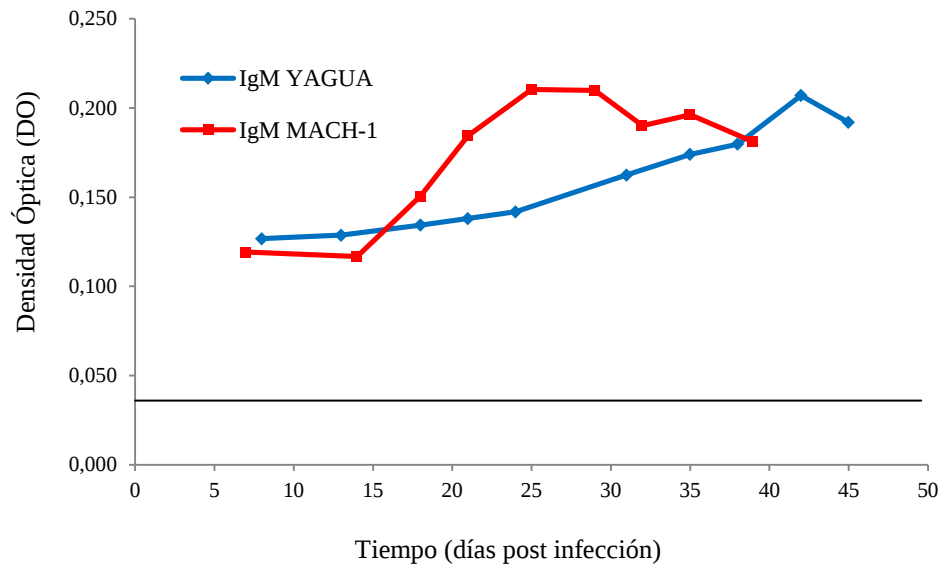


Figura 27. Evolución de la respuesta humoral de tipo IgM en ratones infectados con $2,5 \times 10^3$ par/ratón por vía i.p con el aislado YAGUA y MACH-1. (–) punto de corte para IgM.

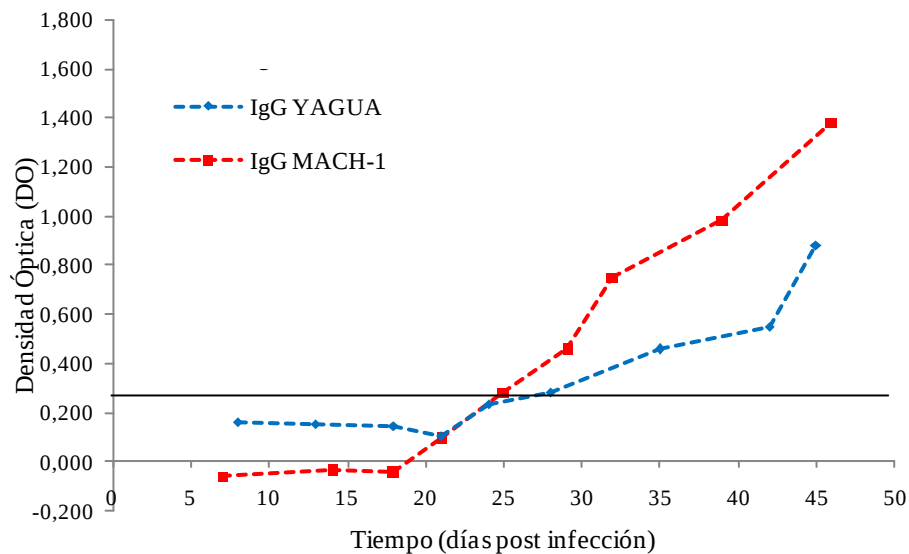


Figura 28. Evolución de la respuesta humoral del tipo IgG en ratones infectados con $2,5 \times 10^3$ par/ratón por vía i.p con el aislado YAGUA y MACH-1. (–) punto de corte para IgG.

5.8.2. Comparación entre la respuesta inmune humoral de los ratones infectados por vía oral con $2,5 \times 10^3$ tripomastigotes de *T. cruzi*: aislados YAGUA y MACH-1.

A pesar de que no se detectaron parásitos en estos animales mediante las evaluaciones parasitológicas ni por PCR ADNk, la evaluación de los sueros sanguíneos mostró anticuerpos contra *T. cruzi* en ambos grupos. En la figura 29 se observa la gráfica correspondiente a la respuesta humoral del tipo IgM. Al igual que en los grupos anteriores (infección intraperitoneal) los títulos de anticuerpos se encuentran por encima del punto de corte y con valores similares a aquellos desde el primer día de evaluación (7 d.p.i.), indicando la seropositividad de los ratones. Ambas curvas tienen una tendencia similar hasta el día 32 p.i. cuando se detectó un aumento de DO en el grupo de sueros de MACH-1 que luego se normalizó a los valores anteriores. Así mismo, se mostró una leve disminución para el grupo YAGUA entre los días 28 y 35, seguido de un aumento hasta alcanzar valores similares a los mostrados anteriormente.

En la figura 30 se muestran las curvas de la respuesta humoral del tipo IgG de los sueros obtenidos de animales infectados por vía oral. A diferencia del grupo anterior (infección intraperitoneal - figura 28), la seropositividad de los ratones fue evidente desde el primer día de evaluación, con valores mucho más altos que la línea de corte. Para el aislado MACH-1 los valores inicialmente muy elevados durante la primera semana de evaluación, disminuyeron abruptamente a partir del día 14 hasta el 21 p.i. encontrándose por debajo de la línea de corte (negativos). Luego el día 32 aumentaron nuevamente (seropositividad) manteniéndose constante hasta el último día de evaluación con valores aproximadamente 4,5 veces menor que el máximo valor inicial (día 14 p.i.) (figura 30). La curva correspondiente a la IgG del grupo YAGUA oral, muestra que los valores elevados al

inicio (7 d.p.i.) disminuyeron abruptamente hasta el día 14 p.i. y se mantuvieron negativos durante el resto de la evaluación. El valor máximo de seropositividad fue menor que para el aislado MACH-1 (aproximadamente 2,4 veces).

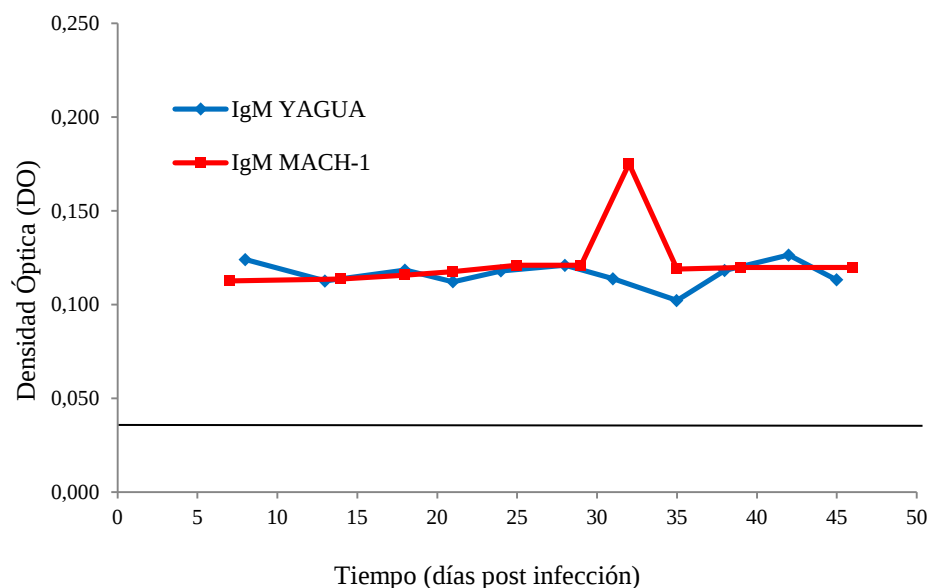


Figura 29. Evolución de la respuesta humoral de tipo IgM en ratones infectados con $2,5 \times 10^3$ par/ratón por vía oral con el aislado YAGUA y MACH-1. (–) punto de corte para IgM.

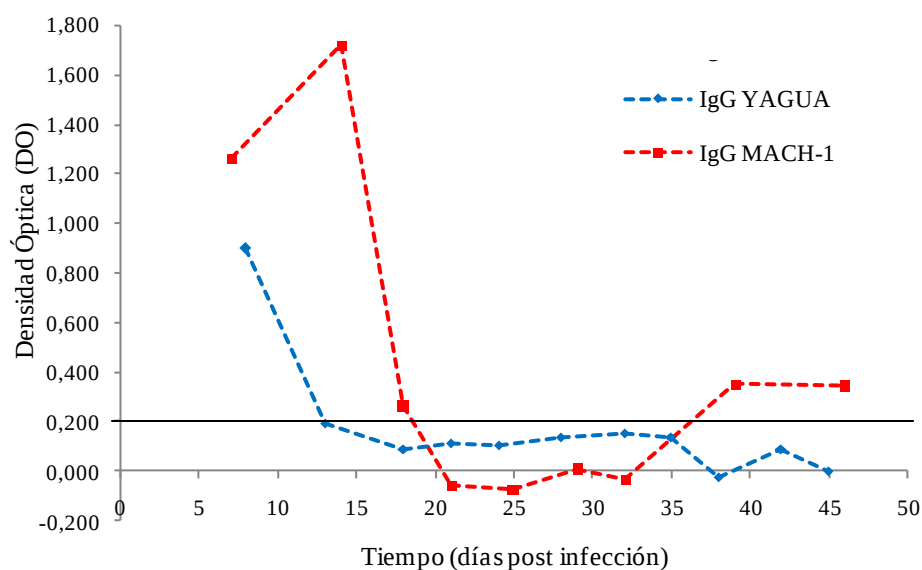


Figura 30. Evolución de la respuesta humoral de tipo IgG en ratones infectados con $2,5 \times 10^3$ par/ratón por vía oral con el aislado YAGUA y MACH-1. (–) punto de corte para IgG.

Al evaluar la respuesta de anticuerpos IgM en el suero de ratones infectados por vía oral con inóculos más elevados del aislado MACH-1 (50.000, 100.000, 200.000 y 400.000), se observaron valores similares a los detectados con el inóculo de 2.500 parásitos vía oral (figura 30, línea roja). Mientras que para la IgG, solo en los grupos de 50.000 y 400.000 parásitos/ratón el comportamiento fue similar al observado con el menor inóculo (2.500, figura 30). Por el contrario en los grupos de 100.000 y 200.000, aunque no se observó un incremento de la IgG desde el comienzo de la evaluación, si hubo un aumento de anticuerpos entre la tercera y cuarta semana de infección, pero con valores inferiores a los del menor inóculo (2.500). Los gráficos correspondientes a estos ensayos de ELISA se muestran en la figura 31.

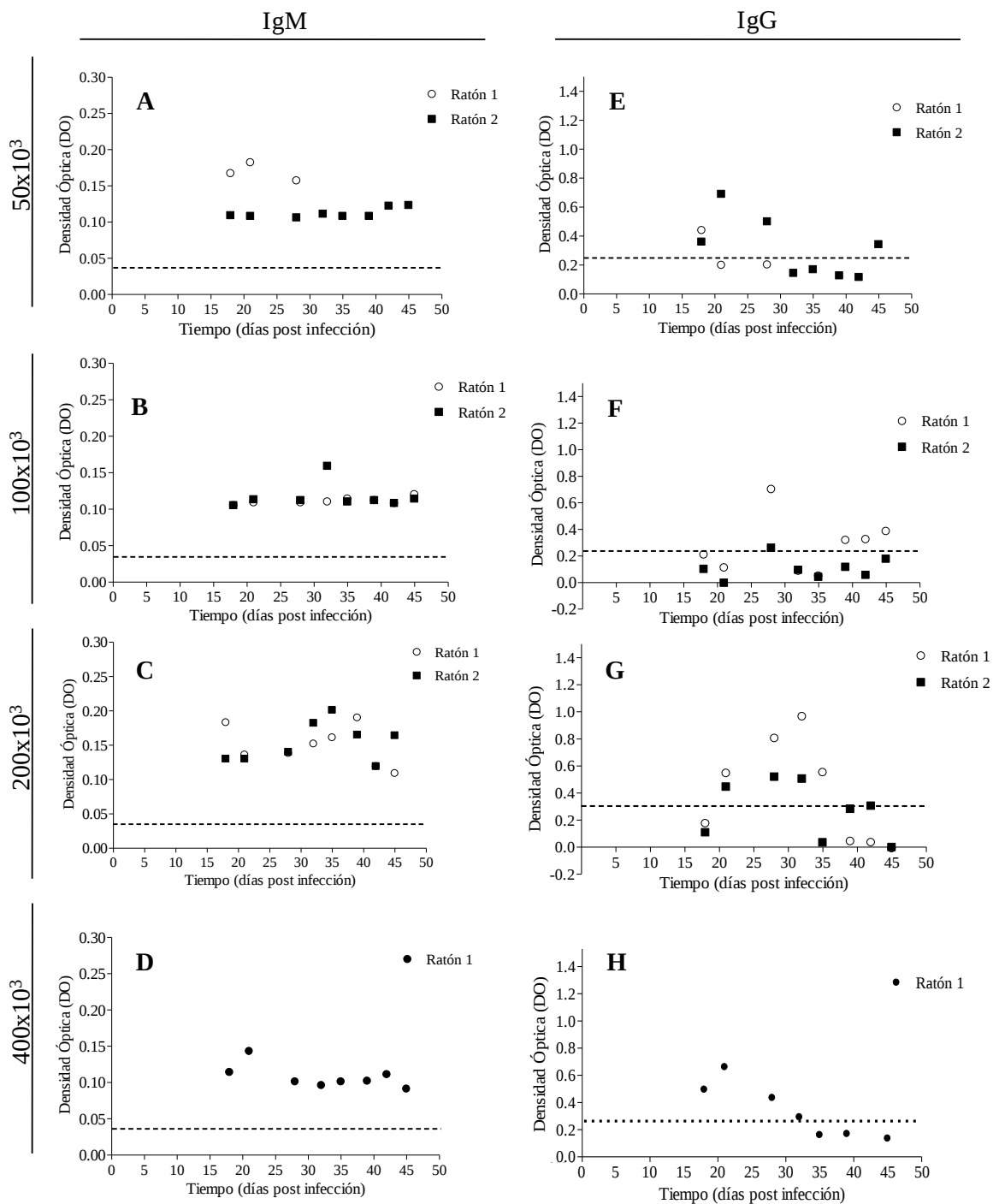


Figura 31. Respuesta humoral de ratones infectados por vía oral con diferentes inóculos del aislado de *T. cruzi* MACH-1. IgM: A= 50×10^3 , B= 100×10^3 , C= 200×10^3 y D= 400×10^3 ; IgG: E= 50×10^3 , F= 100×10^3 , G= 200×10^3 y H= 400×10^3 .

6. DISCUSIÓN

La invasión gradual del domicilio humano por parte del insecto vector *Panstrongylus geniculatus*, ha sido reportada en localidades de la Gran Caracas y zonas circunvecinas desde el año 2000 (Reyes-Lugo, 2011). La deforestación y separación de sus fuentes originales de alimentación, ha ocasionado que los triatomíneos hematófagos y algunos animales silvestres (rabipelados) visiten frecuentemente la vivienda humana en búsqueda de alimento. Estos hechos están siendo asociados a la aparición de los recientes casos agudos de la enfermedad de Chagas (brotes), que se han reportado desde el año 2007 en zonas urbanas del país, como consecuencia de la transmisión oral por ingesta de alimentos contaminados con chips infectados con *T. cruzi* (Martín y col., 2009; Alarcón de Noya y col., 2010; García, 2012; Añez y col., 2013).

En este trabajo se realizó la identificación molecular hasta el nivel de especie *Trypanosoma cruzi*, de protozoarios flagelados que estaban siendo mantenidos en el modelo murino - *Rhodnius prolixus* en el Laboratorio de Inmunología y Quimioterapia. Originalmente los flagelados fueron aislados de la sangre de un ejemplar juvenil de *Didelphis marsupialis* (aislado YAGUA, enero 2011) y de las heces de un adulto de *Panstrongylus* sp. (aislado MACH-1, mayo 2013), ambos hospedadores definitivo e intermediario respectivamente, del ciclo peridoméstico de *T. cruzi* en el Dtto. Capital. El ensayo PCR ADNk (Gomes y col., 1998) evidenció la amplificación de una banda de 330 pb en ambos aislados, ubicando a los flagelados dentro de la especie *Trypanosoma cruzi*. Cabe destacar la importancia del estudio parasitológico de estos aislados venezolanos, ya que provienen de dos tipos de hospedadores (mamífero e insecto) y se ha sugerido que pudieran existir subpoblaciones de *T. cruzi* en la misma área geográfica (Gran Caracas en

este caso) y por ende un comportamiento diferente en el humano que adquiere la infección de una u otra fuente (Morel y col., 1980; Guzmán-Marín y col., 1999; Gonzales y col., 2004). De hecho, tal como lo demuestran nuestros resultados se detectó un comportamiento parasitológico distinto en el ratón según el aislado empleado. La extrapolación de estos resultados a la infección humana podría contribuir al entendimiento de las recidivas y patologías que actualmente están desarrollando los pacientes infectados en el Distrito Capital (Alarcón de Noya y col., 2013), ya que muy probablemente los aislados estudiados pudieran estar involucrados en el ciclo peridoméstico de *T. cruzi* y que están circulando en esta zona urbana, ocasionando los recientes brotes de la enfermedad de Chagas. Así mismo, pusimos en evidencia que de acuerdo a la vía de inoculación (oral o intraperitoneal) hay una variación en la respuesta inmunológica del animal infectado experimentalmente.

Se ha descrito que la diversidad en la respuesta del hospedador debido a la vía de inoculación o puerta de entrada de *T. cruzi*, podría deberse a diversas variables tales como, la heterogeneidad entre la composición genética del hospedador y las poblaciones de parásitos (Murfin y col., 1985). En este sentido, las infecciones experimentales con *T. cruzi* suelen llevarse a cabo a partir de tripomastigotes metacíclicos (heces de chipos), tripomastigotes sanguíneos (sangre de mamíferos), o con tripomastigotes de cultivo, usando las vías de inoculación intraperitoneal y subcutánea, a fin de simular las condiciones del mecanismo de transmisión vectorial. La vía de administración oral es otra alternativa, no obstante, es menos utilizada. En este sentido, las primeras investigaciones realizadas con esta vía de inoculación demostraron el establecimiento de la infección a través de la mucosa oral o faríngea, cuando se logró la infección de animales experimentales al suministrarles como bebida una mezcla de leche con tripomastigotes metacíclicos provenientes de heces de *Rhodnius prolixus* (Grasse, 1952). Estos resultados permitieron concluir que en

condiciones naturales los vertebrados son capaces de adquirir la infección con *T. cruzi* por la vía buco-gástrica (Díaz-Ungria, 1954).

Evaluaciones preliminares a nuestra investigación, realizadas en el laboratorio de Inmunología y Quimioterapia del IBE, con aislados de *T. cruzi* provenientes de chipos y rabipelados del Distrito Capital, evidenciaron una parasitemia muy baja y de corta duración en los ratones infectados, al mismo tiempo que era posible detectar la presencia y persistencia de grandes cantidades de tripomastigotes en la cavidad peritoneal de estos animales, inclusive durante la fase crónica (no publicado). Estas observaciones nos conllevaron a realizar esta investigación empleando tripomastigotes obtenidos de la cavidad peritoneal para la preparación del inóculo (≥ 2.500 parásitos/ratón). Esta cavidad resultó ser una fuente alternativa de parásitos con capacidad infectiva que nos permitió llevar a cabo los experimentos de evaluación inmunoparasitológica de los aislados, ya que como lo demuestran nuestros resultados la cantidad de parásitos en sangre es muy baja.

Araujo y colaboradores (2011) reportaron el hallazgo de tripomastigotes en la cavidad peritoneal de pacientes inmunosuprimidos con ECh y en ratones con ascitis infectados experimentales por vía subcutánea con *T. cruzi*. Se ha sugerido que la presencia de estos tripomastigotes en la cavidad peritoneal puede deberse a la composición bioquímica de la zona: la presencia de lípidos, ácidos grasos y ácido hialurónico, que mantienen un ambiente adecuado para la multiplicación del parásito (Lugo de Yarbuh y col., 2013). Estos autores reportaron que los tripomastigotes intraperitoneales son morfológicamente similares a los tripomastigotes sanguíneos con predominancia de las formas rechonchas, por lo que podrían estar estrechamente relacionados. Estos datos recientes apoyan más aun nuestra idea de emplear tripomastigotes intraperitoneales para realizar las infecciones. Es de hacer notar que nuestro trabajo constituye el primer reporte

sobre el uso de tripomastigotes de la cavidad peritoneal para realizar infecciones experimentales en el modelo murino, tanto por la vía de administración oral como intraperitoneal.

La metodología propuesta para preparar los inóculos a partir de tripomastigotes intraperitoneales (apartado 4.6), nos permitió llevar a cabo las infecciones de los diferentes grupos experimentales y comparar la respuesta inmunoparasitológica del hospedador frente a los distintos aislados del ciclo peridoméstico, variando parámetros como la vía de inoculación y el tamaño del inóculo. El estudio del exudado intraperitoneal en los ratones infectados con los aislados YAGUA y MACH-1, reveló la presencia de formas alargadas al inicio de la fase aguda (primera semana de infección) y posteriormente se hizo frecuente la presencia de formas rechonchas predominantemente. Así mismo, el hallazgo de células parasitadas con amastigotes intracelulares en el líquido intraperitoneal de ratones infectados con el aislado MACH-1 a los 21 d.p.i. (figura 16), demostró la multiplicación de *T. cruzi* en la cavidad abdominal de estos animales, coincidiendo con los valores máximos en las curvas de parasitemia y cinética de tripomastigotes intraperitoneales. Por el contrario, no fue posible detectar células parasitadas en el exudado de ratones infectados con el aislado YAGUA durante los días evaluados, lo cual no implica que no estuviese ocurriendo este proceso de multiplicación celular en la cavidad.

Hasta la fecha no existen datos en la bibliografía acerca de la cinética de los tripomastigotes en la cavidad peritoneal durante la fase aguda experimental, ni de la parasitemia obtenida tras infectar con tripomastigotes intraperitoneales. Al comparar la respuesta parasitológica entre los ratones de un mismo grupo experimental, ya sea inoculado por vía intraperitoneal u oral, encontramos diferencias importantes ya que en algunos animales se detectaron parásitos en sangre y/o en la cavidad abdominal. La

aplicación del hematocrito, una prueba parasitológica de mayor sensibilidad a los ratones negativos en los dos ensayos anteriores, demostró que todos los animales evaluados continuaban mostrándose negativos (Tablas 3 y 4). Sin embargo, al aplicar el diagnóstico molecular (PCR) a estos ratones parasitológicamente negativos, se logró evidenciar la banda de 330pb correspondiente a ADN de *T. cruzi* en algunos casos, por lo que en estos ratones positivos a la PCR se consideró establecida la infección aguda, y se promediaron sus valores de parasitemia y cinética de tripomastigotes peritoneales (cero durante toda la evaluación) para la elaboración de las respectivas curvas. Por el contrario, los ratones que también resultaron negativos al ensayo molecular fueron descartados al momento de realizar las curvas por considerarlos no infectados (Tablas 3 y 4). En ocasiones una banda de 550 pb (figura 11) y bandas menores a 200 pb (figuras 25 y 23) fueron observadas en algunos ensayos moleculares, estos resultados concuerdan con lo reportado por Miyamoto y colaboradores (2006) quienes observaron bandas comprendidas entre 600 y 400 pb y otras menores a 200 pb. Estos autores indican que la amplificación de regiones del ADN genómico del ratón puede ocurrir al aplicar el protocolo de Gomes y colaboradores (1998) que fue diseñado para muestras de sangre humana.

El análisis del comportamiento parasitológico de los ratones inoculados con 2.500 parásitos/ratón por vía i.p., demostró que en el grupo correspondiente al aislado YAGUA, hubo menor porcentaje de sobrevivencia (80%). En cuanto a la evaluación de la parasitemia y cinética de tripomastigotes intraperitoneales, se observó un período prepatente mayor y una mayor capacidad de proliferación de *T. cruzi* en ambos ensayos, con respecto a lo observado en el grupo correspondiente al aislado MACH-1. En este se detectó un período prepatente mas corto tanto en la parasitemia como en la cinética y menor cantidad de parásitos en ambos ensayos a lo largo de la fase aguda. Estos datos podrían estar

relacionados con el 100% de sobrevivencia observado, ya que además la respuesta de anticuerpos IgM e IgG en sangre fue más temprana y los títulos fueron mayores que los del grupo infectado con el aislado YAGUA (Grupo A). Lo descrito hasta aquí nos permite proponer que la cavidad peritoneal podría estar actuando como un posible reservorio del parásito para evadir la respuesta inmunológica humoral.

Herrera y colaboradores (2003) reportaron que animales infectados directamente con tripomastigotes metacíclicos provenientes de las glándulas anales de *D. marsupialis*, produjeron altos niveles de parasitemia, virulencia y mortalidad. Mientras que aquellos animales que infectaron con tripomastigotes metacíclicos de *Panstrongylus geniculatus* presentaron valores más bajos de parasitemia. Estos datos podrían correlacionarse con nuestros resultados para el aislado de *T. cruzi* YAGUA (proveniente de rabipelado) con respecto al aislado MACH-1 (procedente de chipo). Sin embargo, la mortalidad reportada por Herrera y colaboradores (2003) fue de 100%, contrario a lo obtenido con el aislado MACH-1 (0% mortalidad). Estas diferencias podrían deberse a que los parásitos empleados en el reporte antes mencionado, provenían directamente de los hospedadores silvestres, mientras que en nuestra investigación los parásitos habían sido mantenidos en el modelo ratón-*Rhodnius prolixus* antes de ser utilizados, como se mencionó anteriormente. En este sentido, se ha demostrado que las propiedades biológicas de los tripomastigotes metacíclicos son alteradas durante el paso seriado a través de hospedadores vertebrados (animales experimentales) e insectos vectores como el *R. prolixus* al mantener el ciclo de vida del parásito en el laboratorio (Contreras, 1994). De igual forma, las propiedades biológicas podrían variar a consecuencia de alteraciones en el genoma de *T. cruzi* como resultado de las modificaciones ambientales (Alves y col., 1994).

Investigaciones realizadas sobre la capacidad infectiva de tripomastigotes metacíclicos y tripomastigotes sanguíneos han mostrado que existen diferencias al administrarlos en ratones por vía oral (Hoft y col., 1996). Estos autores ensayaron varios inóculos, desde 1.000 a 10.000 tripomastigotes sanguíneos/ratón y no evidenciaron una infección sistémica en los ratones, mientras que empleando tan solo 1.000 tripomastigotes metacíclicos/ratón lograron 100% de infección de los ratones. La infección a través de la mucosa bucal depende estrictamente de la interacción entre componentes moleculares del hospedador y el parásito *T. cruzi*, que pueden estar modulando su infectividad (Yoshida 2008; Ramírez y col., 2013). En este proceso intervienen glicoproteínas específicas del estadio tripomastigote, principalmente Gp82 y Gp90, la primera se une a la mucina gástrica y a las células epiteliales del hospedador mediante la activación de la señalización con Ca^{2+} promoviendo la internalización del parásito (Yoshida, 2008) y la segunda actúa regulando negativamente el proceso de infección (Yoshida, 2009).

En concordancia con los datos reportados por Hoft y colaboradores (1996) en nuestra investigación con el inóculo de 2.500 parásitos/ratón ensayado inicialmente, no obtuvimos evidencias parasitológicas, ni moleculares del éxito de una infección aguda inoculando en la mucosa oral (0% de infección). Esto podría deberse a características propias de cada individuo o bien a la eliminación temprana del parásito a través de la acción del sistema inmunológico, lo cual explicaría los altos niveles de IgG al comienzo de la evaluación (7 d.p.i.) en los ratones inoculados por vía oral con 2.500 parásitos/ratón de los aislados YAGUA y MACH-1 (ver figura 30). Dados estos resultados preliminares, nos propusimos entonces aumentar la dosis de parásitos suministrados por vía oral. Como lo muestran nuestros resultados, el uso de un inóculo 20 veces mayor (50.000 parásitos/ratón) resultó en un 80% y 100% de infección para los aislados YAGUA (n=5) y MACH-1 (n=2),

respectivamente. Cabe destacar la variabilidad en la respuesta mostrada entre los ratones de un mismo grupo, ya que en los inoculados con el aislado YAGUA (50.000-oral), 20% resultó positivo a las pruebas parasitológicas y 60% fueron positivo solo al diagnóstico molecular (total = 80% de infección) (Tabla 3). Mientras que de los ratones infectados con el aislado MACH-1 (50.000-oral), 50% presentó tanto tripomastigotes sanguíneos como intraperitoneales y 50% resultó positivo al ser evaluado por PCR ADNk, evidenciándose el éxito de la infección al aumentar la cantidad de parásitos administrados oralmente. Al igual que lo observado con el inóculo menor (2.500) por vía oral, el análisis serológico de estos ratones mostró valores elevados de anticuerpos IgG contra *T. cruzi* al inicio de la evaluación, sin embargo, en este caso al aumentar el inóculo se pudo establecer la infección por lo que aparentemente la respuesta inmunológica fue insuficiente para erradicar el parásito.

Estudios similares a los llevados a cabo en nuestro trabajo fueron realizados recientemente por otro grupo de investigadores, pero empleando tripomastigotes sanguíneos e inóculos de 10.000 y 50.000 suministrados por vía oral. Los resultados mostraron ausencia de parasitemia, hemocultivo y PCR negativo en el grupo infectado con 10.000 parásitos; mientras que los inoculados con 50.000 parásitos mostraron bajas tasas de infectividad y parasitemia (Malaquías y col., 2013).

La evaluación histopatológica del tejido cardíaco de ratones infectados con el aislado YAGUA de *T. cruzi*, evidenció la presencia de nidos de amastigotes a los 28 d.p.i., coincidiendo este hallazgo con los valores máximos de parasitemia detectados. Así mismo, no se detectó la presencia de infiltrado celular inflamatorio alrededor o en las cercanías de los cardiomiocitos infectados. Varios autores han reportado un marcado tropismo cardíaco de las cepas venezolanas de *T. cruzi* (Urdaneta-Morales, 1988; Herrera, 1990; Añez y col.,

2003; Morocoima y col., 2008; Arismendi y col., 2009). Estos reportes coinciden con la ausencia ó escasa presencia de infiltrado celular inflamatorio cardíaco. El mecanismo por el cual se establecen las diferentes formas clínicas aun no se conoce con exactitud, pero es evidente la existencia de un papel fundamental asociado a los genes del parásito. En Venezuela se ha detectado con amplio predominio la presencia de *T. cruzi* DTU I y se ha relacionado con cardiopatías (Miles y col., 1981; Carrasco y col., 2012), por lo que es posible sugerir que los aislados utilizados para este estudio podrían pertenecer genéticamente al grupo DTU I. Cabe mencionar que durante toda la experimentación, un ratón del grupo YAGUA, 2.500, vía i.p., presentó las características externas de la enfermedad de Chagas y luego se recuperó totalmente mientras que el resto de los animales en los demás grupos experimentales no mostraron signos externos de la enfermedad, sugiriendo la cronicidad de los aislados estudiados.

El establecimiento de la infección experimental con *T. cruzi* por vía intraperitoneal, induce una respuesta inmunológica del tipo humoral típica de enfermedades infecciosas Lorca y colaboradores (1995) y Umezawa y colaboradores (1996). Las pruebas serológicas para los ratones inoculados por vía intraperitoneal con los aislados *T. cruzi* YAGUA y MACH-1 evidenciaron la producción de anticuerpos del isotipo IgM al inicio de fase aguda y luego de dos a tres semanas (21 y 25 d.p.i.) comenzó la producción de anticuerpos del isotipo IgG que persistieron durante el resto de la infección, coincidiendo con lo reportado.

Los títulos de las diferentes subclases de anticuerpos tipo IgG se relacionan con el estado de la enfermedad y la patología desarrollada en pacientes chagásicos. En el ser humano la detección de los anticuerpos IgG se evidencia entre los 10 a 14 días después de adquirida la infección, alcanzando valores máximos entre los 30 y 60 días que posteriormente disminuyen y permanecen títulos bajos de por vida en pacientes crónicos

(Montiel y Díaz, 2002). Estos reportes se corresponden con lo observado en nuestro trabajo usando el modelo murino-*T. cruzi* infectando por vía intraperitoneal con ambos aislado.

Por otra parte, un hallazgo novedoso en esta investigación y que no ha sido reportado hasta la fecha, fue la detección de títulos altos de IgG al inicio de la infección experimental por vía oral. Esta respuesta inmunológica fue observada en los ratones de los distintos grupos (inóculos desde 2.500 a 400.000 parásitos/ratón, vía oral). Estos resultados podrían indicar que la infección oral desencadenó una respuesta inmunológica temprana y por consiguiente una producción de anticuerpos más rápida que la respuesta producida cuando se administran los parásitos por vía intraperitoneal, lográndose la eliminación casi inmediata de los parásitos e impidiendo el establecimiento de la infección cuando la cantidad de parásitos es baja, como sucedió en los grupos inoculados con 2.500 tripomastigotes/vía oral. Sin embargo, al aumentar el inóculo por vía oral la respuesta inmunológica pudo haber resultado insuficiente para erradicar los parásitos (figura 31). Se ha demostrado que la inmunidad de las mucosas es la principal barrera a la que se enfrentan los parásitos inoculados por vía oral, esta contiene grandes cantidades de linfocitos efectores incluso en ausencia de enfermedad y se caracteriza por la presencia de poblaciones distintas de células T efectoras y una elevada producción temprana de IgA secretora (Murphy, 2008). En infecciones por rotavirus transmitidas por vía oral se ha reportado la aparición de anticuerpos específicos IgM, IgG e IgA a partir de los 7 hasta los 28 días post-infección en suero, saliva, contenido duodenal y heces (Hjelt y col., 1986; Coulson, 1990). Lo cual podría relacionarse con nuestros resultados.

Los resultados hasta aquí presentados con *T. cruzi* en la transmisión oral, son muy preliminares por lo que se sugiere un estudio más exhaustivo de la IgG en suero durante la primera semana de infección, para explicar su temprana aparición.

7. CONCLUSIONES

1. El diagnóstico molecular por PCR ADNk de los aislados (YAGUA y MACH-1) los ubicó taxonómicamente en la especie *Trypanosoma cruzi*.
2. Las características morfológicas de los tripomastigotes contenidos en la cavidad peritoneal y en sangre, fueron muy similares en los aislados estudiados. La capacidad infectiva de los tripomastigotes intraperitoneales por las vías de administración empleadas, nos permiten proponerlos como una fuente alternativa para la obtención del inóculo.
3. El estudio histopatológico demostró el cardiotropismo del aislado venezolano "YAGUA".
4. El comportamiento parasitológico de *T. cruzi* mostró variaciones de acuerdo al aislado y la vía de inoculación, lo cual podría sugerir diferencias entre las poblaciones de parásitos que proceden de *Didelphis marsupialis* y *Panstrongylus* sp. del ciclo peridoméstico del Dto. Capital.
5. Concentraciones hasta seis veces mayores de tripomastigotes en la cavidad peritoneal con respecto a la parasitemia, sugieren esta cavidad como un posible reservorio del parásito donde parece lograr evadir la respuesta inmunológica humoral.
6. El ensayo molecular corroboró la inefectividad del menor inóculo de parásitos utilizado (2.500) para establecer una infección aguda por vía oral.
7. Inóculos iguales o superiores a 50.000 tripomastigotes/ratón, permitieron el establecimiento de la infección oral en animales infectados con los aislados YAGUA y MACH-1. En los ratones parasitológicamente negativos, la aplicación de

la prueba de PCR ADNk evidenció el establecimiento de la infección aguda en estas condiciones. Los resultados indican que el incremento del inóculo oral con el aislado MACH-1 no fue proporcional al aumento de la parasitemia y cinética de tripomastigotes intraperitoneales en los ratones.

8. La respuesta inmunológica humoral del tipo IgM contra *T. cruzi* en las infecciones intraperitoneales con ambos aislados incrementó con el desarrollo de la fase aguda, contrariamente a lo ocurrido en los ensayos orales, donde el valor inicial se mantuvo constante. La temprana producción de anticuerpos IgG contra *T. cruzi* en el suero de ratones infectados oralmente con 2.500 tripomastigotes/ratón, sugiere una respuesta humoral efectiva que logró eliminar al parásito.

8. BIBLIOGRAFÍA

1. Aché, A. 1993. Prevalencia de infección humana por *Trypanosoma cruzi* en bancos de sangre en Venezuela. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo* 35(5): 443-448.
2. Aché, A., Matos, A. J. 2001. Interrupting Chagas disease transmission in Venezuela. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo* 43. 37-43.
3. Acquatella, H. 2003. Estado actual de la enfermedad de Chagas en Venezuela y de su manejo terapéutico. *Gac. Méd. Caracas*. 111(2):136-156. URL disponible en: www.scielo.org.ve/scielo.php?pid=s0367-47622003000200009&script=sci_arttext.
[Consulta: 26 de Febrero de 2014]
4. Alarcón de Noya, B., Diaz-Bello, Z., Colmenares, C., Ruiz-Guevara, R., Noya, O. 2010. Enfermedad de Chagas de transmisión oral: vinculación del casi índice con una microepidemia urbana en Venezuela, *Bol Mal Salud Amb.* L, N°1. 135-138.
5. Alarcón de Noya, B., Veas, J., Ruiz-Guevara, R., Martín, A., Rojas, C., Machado, I., Telo, C., Henao, L., Díaz-Bello, Z., Noya, O. 2013. Evaluación clínica y de laboratorio de pacientes hospitalizados durante el primer brote urbano de enfermedad de Chagas de transmisión oral en Venezuela. *Rev Patol Trop.* 42 (2):177-186.
6. Alves, A., Almeida, D., Von Kruger, W. 1994. Changes in *Trypanosoma cruzi* kinetoplasto DNA minicircles induced by environmental conditions and subcloning. *J. Euk. Microbiol.* 4: 415-419.
7. Andrade, Z., 2011. La Patología de la enfermedad de Chagas. Portal web FIOCRUZ.
URL disponible

en:http://www.fiocruz.br/chagas_esp/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?sid=26[Consulta: 11 de mayo de 2013].

8. Añez, N., Carrasco, H., Parada, H., Crisante, G., Rojas, A., González, N. 1999. Acute Chagas disease in western Venezuela: A clinical, seroparasitologic and epidemiologic study. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **60**: 215-222.
9. Añez, N., Crisante, G., Rojas, A., Dávila, D. 2013. Brote de enfermedad de Chagas agudo de posible transmisión oral en Mérida, Venezuela. *Bol Mal Salud Amb.* **53(1)**.
10. Añez, N., Crisante, G., Rojas, A., Diaz, N., Añez-Rojas, N., Carrasco, H., Parada, H., Aguilera, M., Moreno, G., Galíndez-Girón, Sandoval, R., Sandoval, I., Vásquez, L., Nava-Rulo, O., Guerra, F., Uzcátegui, G., Yépez, Y., Rodríguez, C., Bonfante-Cabarcas, R. 2003. La cara oculta de la enfermedad de Chagas. *Bol. Malarinol. y Sal. Amb.* **63(2)**: 45-57.
11. Araújo, S., Alarcón, M., Lugo de Yarbuh, A., Moreno, E. 2011. Eficiencia de un método para la confirmación de la proliferación de *Trypanosoma cruzi* en el líquido ascítico de ratones con infección aguda. *Biomédica*. **31 (3)**:209-421.
12. Arismendi, E., Cedeño, M., Rosales, L. 2009. Caracterización parasitológica de aislados de *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi*, obtenidos de *Didelphys marsupialis* en la población de Cumanacoa, municipio Montes, Estado Sucre. Trabajo especial de grado. Universidad de Oriente, Venezuela.
13. Becerril Marco Antonio. 2011. Parasitología médica. Tercera Edición. Editorial McGraw-Hill, México.
14. Botero, D., Restrepo, M. 1998. Parasitosis Humanas. Tercera Edición. Editorial: Corporación para investigaciones Biológicas. Medellín, Colombia.

15. Brener, Z., Andrade, Z., Barral-Neto, M. 2000. *Trypanosoma cruzi* e Doença de Chagas. Segunda Edición. Editorial Guanabara koogan S.A. Rio de Janeiro Brasil.
16. Carneiro M, Romanha AJ, Chiari E. (1991) Biological characterization of *Trypanosoma cruzi* strains from different zymodemes and schizodemes. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. **86(4)**: 387-393.
17. Carrasco, H., Segovia, M., Llewellyn, M., Morocoima, A., Urdaneta-Morales, S. 2012. Geographical Distribution of *Trypanosoma cruzi* Genotypes in Venezuela. *PLoS Negl Trop Dis* **6(6)**: 1707- 1710.
18. Carrasco, H., Torrellas, A., Garcia, C., Segovia, M., Feliciangeli, M. D. 2005. Risk of *Trypanosoma cruzi* I (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) transmission by *Panstrongylus geniculatus* (Hemiptera: Reduviidae) in Caracas (Metropolitan District) and neighboring States, Venezuela. *Bol Mal Salud Amb*. **46(1)**:91 – 92.
URL disponible en:
http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1690-46482006000100011&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt. [Consulta: 01 de Junio de 2013].
19. CDC. 2010. Centers for Disease Control and Prevention. URL disponible en: <http://www.cdc.gov/parasites/chagas/biology.html>) [Consulta: 20 de Abril de 2013].
20. Comisión de Epidemiología, Venezuela. 2010. Alerta epidemiológica N°133, situación en Venezuela, América latina y el Mundo. *Red Soc Cien Med Ven*. **133**. 1-14. URL disponible en: <http://www.ovsalud.org/doc/red133.pdf>. [Consulta: 4 de Junio de 2013].

21. Consenso del Ministerio de Salud Brasil. 2005. Secretaria de Vigilância em Saúde do Ministério da Saúde Brasil Consenso Brasileiro em Doença de Chagas. *Rev Soc Bras Med Trop.* **38(3)**: 30.
22. Contreras, V., 1994. Elementos de apoyo para trabajar en la enfermedad de Chagas (Propiedades biológicas de metacíclicos de *Trypanosoma cruzi*). Clementes editores C.A. Universidad Carabobo. Valencia, Venezuela.
23. Coulson, B., Grimwood, K., Masendyez, P. 1990. Comparison of rotavirus immunoglobulin A coproconversion with other indices of rotavirus infection in a longitudinal study in childhood. *J Clin Microbiol.* **28**:1367-74.
24. Coura, J. 2013. Chagas disease: control, elimination and eradication. Is it possible?. *Mem.Inst. Oswaldo Cruz.* Rio de Janeiro, Brasil. **108(8)**: 962-967.
25. Coura, J., [Albajar, P.](#) 2010, Chagas disease: a new worldwide challenge. *Nature.* **465**,S6–S7. URL disponible en: http://www.nature.com/nature/journal/v465/n7301_supp/full/nature09221.html. [Consulta: 28 de Mayo de 2013].
26. Coura, J., Dias, J. 2009. Epidemiology, control and surveillance of Chagas disease: 100 years after its discovery. *Mem.Inst. Oswaldo Cruz.* Rio de Janeiro, Brasil. **104(1)**: 31-40.
27. De Souza, W. 2000. O parasite e sua interação com os hospedeiros. En: Brener, Z., Andrade, Z., Barral-Neto, M. 2000. *Trypanosoma cruzi* e Doença de Chagas. Segunda Edicion. Editorial Guanabara koogan S.A. Rio de Janeiro Brasil.
28. Dias JC. 2006. Notas sobre o *Trypanosoma cruzi* e suas características bioecológicas, como agente de enfermidades transmitidas por alimentos. *Rev Soc Bras Méd Trop.* **39**: 370-375.

29. Diaz-Ungria, C. 1954. Transmisión experimental de *Trypanosoma cruzi* en los vertebrados. I. Contaminación bucal a partir de las heces de *Rhodnius prolixus* infectados. *Rev Vet Venez.* **16(95)**: 341-352.
30. dos Reis, G., Lopes, M. 2000. A resposta imune á Infecção pelo *Trypanosoma cruzi* em modelos experimentais. En: Brener, Z., Andrade, Z., Barral-Neto, M. *Trypanosoma cruzi* e Doença de Chagas. Segunda Edición. Editorial Guanabara koogan S.A. Rio de Janeiro Brasil.
31. DSA. 2000. Archivos de la Dirección de Salud Ambiental. Maracay, Venezuela.
32. Feliangeli, M. D. 2009. Control de la Enfermedad de Chagas en Venezuela. logros pasados y retos presentes. *Interciencia.* **34(6)**:393-399. URL en: <http://www.anm.org.ve/FTPANM/online/2013/boletines/N49/10-DORA-FELICIANGELI-Control-de-la-Enfermedad-de-Chagas-en-Venezuela.pdf> [Consulta: 21 de mayo de 2013].
33. Feliangeli, M. D., Carrasco, H., Patterson, J. S., Suarez, B., Martínez, C., Medina, M. 2004. Mixed domestic infestation by *Rhodnius prolixus* Stal, 1859 and *Panstrongylus geniculatus* Latreille, 1811, vector incrimination, and seroprevalence for *Trypanosoma cruzi* among inhabitants in El Guamito, Lara State, Venezuela. *Am J Trop Med Hyg* **71(4)**:501-505.
34. García, N. 2012. Seroprevalencia y Análisis de los factores de riesgo relacionados en la transmisión de la infección por *Trypanosoma cruzi* en la población rural del estado sucre, Venezuela. Magister Scientiarum. Universidad de Oriente. Cumana, Venezuela.
35. Gascón, J., Bern, C., Pinazo, M. J. 2010. Chagas disease in Spain, the United States and other non-endemic countries. *Acta Trop.* **115**: 22–27

36. Gomes, M., Macedo, A., Vago, A. 1998. *Trypanosoma cruzi*: Optimization of polymerase chain reaction for detection in human blood. *Exp Parasitol.***88**:28-33.
37. González, N., Carrasco, H., Urdaneta-Morales, S., Martínez, C., Herrera, L. 2004. Comportamiento de genotipos de *Trypanosoma cruzi* en *Rhodnius prolixus* experimentalmente infectado: aproximación biológica y molecular a fenómenos de competencia. *Salus online.* **12(1)**:175.
38. Grasse, P.P. 1952 *Traité de Zoologie*, 1, Pase. I. Masson et Cie Paris.
39. Guerrero, L., Domínguez-Quesada, M., García-Martín, G., Borges, L. 1965. Estado actual de la campaña contra la enfermedad de Chagas en Venezuela. *Arch. Venez. Med. Trop. Parasitol.* **5**:219-265.
40. Guhl, F., Ramírez, J. D. 2011. *Trypanosoma cruzi* I diversity: Towards the need of genetic subdivision?. *Acta Trop.* **119**:1-4.
41. Gürtler, R., Segura, E., Cohen, J. 2003. Congenital Transmission of *Trypanosoma cruzi* Infection in Argentina. *Emerging Infectious Diseases. EID Journal.* **9**:29-32.
URL disponible en: <http://www.cdc.gov/ncidod/EID/vol9no1/pdfs/02-0274.pdf>.
[Consulta: 28 de abril de 2013]
42. Guzmán-Marín, E., Zavala-Castro, J., Acosta-Viana, K., Rosado-Barrera, M. 1999. Revisión: Importancia de la caracterización de cepas de *Trypanosoma cruzi*. *Rev Biomed* **10**:177-184.
43. Herrera, L. 1990. Caracterización biológica de cepas de *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi* Chagas, 1909 aisladas de *Didelphis marsupialis* del Valle de Caracas: consideraciones sobre algunas implicaciones epidemiológicas. Tesis Especial de Grado. Universidad Central de Venezuela.

44. Herrera, L., Urdaneta-Morales, S., Carrasco, H. 2003. *Trypanosoma cruzi*: behavior OF metatrypomastigotes from *Didelphis marsupialis* and *Panstrongylus geniculatus*. *Rev Cient. FCV-LUZ*. **13(4)**:307-311.
45. Herrera, Leidi. 2010. Una revisión sobre reservorios de *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi* (Chagas, 1909), agente etiológico de la Enfermedad de Chagas. *Bol Mal Salud Amb*. **50(1)**: 3-15.
46. Hjelt, K., Grauballe, P., Andersen, L., Schiotz, P., Howitz, P., Krasilnikoff, P. 1986. Antibody response in serum and intestine in children up to six months after a naturally acquired rotavirus gastroenteritis. *J. Pediatr Gastroenterol Nutr*. **5**:74-80.
47. Hoft, DF., Farrar PL., Kratz-Owens, K., Shaffer, D. 1996. Gastric invasion by *Trypanosoma cruzi* and induction of protective mucosal immune responses. *Infect Immun*. **64**: 3800-3810.
48. Junqueira, A., Degraive, W., Brandão, A. 2005, Minicircle organization and diversity in *Trypanosoma cruzi* populations. *Trends in Parasitol*. **21**: 270-272.
49. Kinoshita-Yanaga, A, Toledo, M., Araújo, S., Vier, B., Gomes, M. 2009. Accidental infection by *Trypanosoma cruzi* follow-up by the polymerase chain reaction: case report. *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo*, **51**: 295-298.
50. Levine, N., Coorlis, J., Cox, F., Deroux, G., Grain, J. 1980. A newly revised classification of the Protozoa. *The Journal of Protozoology* **27**: 37-58.
51. Lewis, M., Ma, J., Yeo, M., Carrasco, H., Llewellyn, M., Miles, M., 2009. Genotyping of *Trypanosoma cruzi*: Systematic Selection of Assays Allowing Rapid and Accurate Discrimination of All Known Lineages. *Am J Trop Med Hyg*. **81(6)**:1041–1049.

52. Lorca, M., Gonzalez, A., Veloso, C., Reyes, V., Vergara, U. 1992. Immunodetection of antibodies in sera from symptomatic and asymptomatic Chilean Chagas' disease patients with *Trypanosoma cruzi* recombinant antigens. *Am. J. Trop. Med. Hyg.***46**:44–49.
53. Lugo de Yarbuh, A., Cáceres, K., Sulbarán, D., Araujo, S., Moreno, E., Carrasco, H., Colasante, C., Mogollón, N., Alarcón, M. 2013. Proliferación de *Trypanosoma cruzi* en la membrana peritoneal y líquido ascítico de ratones con infección aguda *Bol Mal Sal Amb.***53 (2)**: 146-156
54. Luquetti, A., Rassi, A. 2000. Diagnóstico Laboratorial da infecção pelo *Trypanosoma cruzi*. En: Brener, Z., Andrade, Z., Barral-Neto, M. *Trypanosoma cruzi* e Doença de Chagas. Segunda Edición. Editorial Guanabara koogan S.A. Rio de Janeiro Brasil.
55. Mansfield J. 1984. Parasitic Diseases. The Chemotherapy. 2th Edition. School of Medicine University of Louisville, Kentucky.
56. Marcano, P. 2012. Reportan 4 casos de Chagas en Caracas. *Últimas Noticias*. URL disponible en: <http://www.ultimasnoticias.com.ve/noticias/ciudad/salud/reportan-4-casos-de-chagas-en-caracas.aspx> [Consulta: 20 de Marzo de 2013].
57. Marin-Neto, J., Simões, M., Lima, A. 2000. Forma Crônica Cardíaca. En: Brener, Z., Andrade, Z., Barral-Neto, M. 2000. *Trypanosoma cruzi* e Doença de Chagas. Segunda Edición. Editorial Guanabara koogan S.A. Rio de Janeiro Brasil.
58. Martin, A., Alarcón de Noya, B., Montero, R., Rojas, C., Garrido, E., Ruíz-Guevara, R., Díaz-Bello, Z. 2009. Epidemia de Chagas agudo adquirido en una escuela de Caracas: Descripción de caso índice. *Arch. Venez. Puer. Ped.* **72(3)**.

59. Mayer P, (1903) Notiz über Hämatein und Hämalan. Zeitschrift für wissenschaftliche Mikroskopie und für mikroskopische. *Technick*. **20**: 409.
60. Miles, M., Cedillos, R., Povia, M., de Souza, A., Prata, A., Macedo, V. 1981. Do radically dissimilar *Trypanosoma cruzi* strains (zymodemes) cause Venezuelan and Brazilian forms of Chagas disease? *Lancet* **317**: 1338-1340.
61. Miyamoto, C., Gomes, M., Marangon, A., Araújo, S., Bahia, M., Lana, M., Toledo, M. 2006. *Trypanosoma cruzi*: Sensitivity of the polymerase chain reaction for detecting the parasite in the blood of mice infected with different clonal genotypes. *Exp Par*. **112**: 198–201.
62. Montiel, G., Diaz, G. 2002. Respuesta inmune de las células del hospedero a la infección por *Trypanosoma cruzi*. *Rev. méd. Hosp. Nac. Niños* (Costa Rica). **37(2)**: 57-63.
63. Morel, C., Chiari, E., Camargo, E., Mattei, D., Romanha, A., Simpsom, L. 1980. Strains and clones of *Trypanosoma cruzi* can be characterized by patterns of restriction endonuclease products of kinetoplast DNA minicircles. *Proc. Nat. Acad. Sci.* **77**: 6810-6814.
64. Morocoima, A., Tineo, E., Ferrer, E., Herrera, L., Nuñez, M. 2008. Enfermedad de Chagas en el estado Anzoátegui, Venezuela. Registro de un caso agudo y caracterización parasitológica y molecular del aislado. *Bol Mal Salud Amb*. **48(2)**: 121-126.
65. Murfin, D., Choromanski, L., Kuhn, R. 1985. Production and characterization of clones of the Brazil strain of *Trypanosoma cruzi*. *J Parasitol* **71**: 525-529.
66. Murphy, M. 2008. Diarrea con sangre. En Europa le temen a la Enfermedad Inflamatoria Intestinal y nosotros al SUH. *Conexión Pediátrica*. **1(4)**.

67. Pedreira de Castro MA, Brener Z. 1985. Estudo parasitológico, e anátomo-patológico da fase aguda da doença de Chagas em cães inoculados com duas diferentes cepas do *Trypanosoma cruzi*. *Rev Soc Bras Med Trop.*; **18(4)**: 223-29.
68. Pereira, K., Barbosa, R., Passos, L., Aguiar, F., Rogez, H., Alarcón de Noya, B., Noya, O. 2009. *Trypanosoma cruzi*. Capítulo VII En: Foodborne protozoan parasites. Robertson, L.J. & Smith, H.V. Editors. Nova Science Publishers, Inc. New York.
69. Piat, G. Almirón, J., Romano, J., Romano, M. 2009. Chagas congénito revisión de una enfermedad curable y subestimada. *Rev. posgrado Via. Cátedra Med.* **193**. 16-21.
70. Pifano, F. 1941. La epidemiología de la Enfermedad de Chagas en el estado Yaracuy. *Rev. San. Asist. Soc.* **6**: 303-310.
71. Ramirez, J., Montilla, M., Cucunubá, Z., Floréz, A., Zambrano, P., Gulh, F. 2013. Molecular Epidemiology of Human Oral Chagas Disease Outbreaks in Colombia. *PLOS Neglected Tropical Diseases*. **7 (2)**: 1-7.
72. Ramírez-Pérez, J. 1985. Chipos de Venezuela. Universidad Central de Venezuela.
73. Rassi, A. Rassi, A. J., Gabriel, G., 2000. Fase Aguda. En: Brener, Z., Andrade, Z., Barral-Neto, M. *Trypanosoma cruzi* e Doença de Chagas. Segunda Edicion. Editorial Guanabara koogan S.A. Rio de Janeiro Brasil.
74. Rassi, A., Luquetti, A. O. 1992. Therapy of Chagas disease En: Wendel S., Brener Z., Camargo M.E. & Rassi, A. Chagas disease (American Trypanosomiasis): its impact on transfusion and clinical medicine. ISBT São Paulo, Brazil 237-247

75. Rey, L. 1991. Parásitos e Doenças Parasitarias do Homen nas Americas e na Africa. Segunda Edição. Ed. Guanabara Koogan S.A. Rio do Janeiro, Brasil.
76. Reyes-Lugo, M. 2011. El Chipo y la enfermedad de Chagas. *RevBotica*, **6**: 01-02. URL disponible en: www.reinaldogodoyeditor.com.ve/revista_botica/Botica_6.pdf.
.. [Consulta: 28 de abril de 2013].
77. Reyes-Lugo, M., Rodríguez-Acosta, A. 2000. Adomiciliation of the sylvatic Chagas disease vector *Panstrongylus geniculatus* Latreille, 1811 (Triatominae: Reduviidae) in Venezuela. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **94**: 508.
78. Ribeiro A., Costa, M. 2000. Forma Indeterminada da Doença de Chagas . En: Brener, Z., Andrade, Z., Barral-Neto, M. *Trypanosoma cruzi* e Doença de Chagas. Segunda Edicion. Editorial Guanabara koogan S.A. Rio de Janeiro Brasil.
79. Rísquez, A. 2009. Mortalidad por enfermedad de Chagas. A propósito de los brotes de Chagas agudo como enfermedad reemergente de transmisión alimentaria. *Gac Méd Caracas*. **117(4)**:319-321.
80. Rodríguez-Bonfante, C., Amaro, A., García, M., Mejías Wohlert, L., Guillen, P., García, R., Álvarez, N., Díaz, M., Cárdenas, E., Castillo, S., Bonfante-Garrido, R., Bonfante-Cabarcas, R. 2007. Epidemiología de la enfermedad de Chagas en el municipio Andrés Bello, Lara, Venezuela: infestación triatomínica y seroprevalencia en humanos. *Artigo. Cad. Saúde Pública*, Rio de Janeiro, **23(5)**:1133-1140.
81. Rosales-Borjas, D., Ortiz-Ortiz, L. 2008. Infecciones parasitarias: mecanismos de evasión de la respuesta inmune. *Revista Médica de la Extensión Portuguesa-ULA*. Portuguesa, Venezuela. **2(2)**: 89-98.

82. Rosales-Borjas, D., Ortiz-Ortiz, L. 2008. Infecciones parasitarias: Mecanismos de evasión de la respuesta inmune. *Rev Méd de la Ext Portuguesa - ULA*. **2(2)**.
83. Salfelder, K., Sauerteig, E., Novoa, D., De Liscano, T.R., Carrero, J.E. 1977. Las protozoonosis en el Hombre Atlas en color. Fundación Vollmer y Fundación Polar, Caracas, Venezuela.
84. Sanoja, C. 2001. Parámetros en la quimioterapia experimental de la enfermedad de Chagas: evaluación comparativa de inhibidores de la síntesis de ergosterol en el modelo murino. Trabajo para optar por la categoría de Profesor Asistente. Universidad Central de Venezuela. Caracas, Venezuela.
85. Sanoja, C. 2010. Respuesta inmunoreguladora y su relación con la inmunopatología cardíaca en la infección por *Trypanosoma cruzi*. Tesis Doctoral. Universidad Autónoma de Madrid. Madrid, España.
86. Schijman, A. 2008. Guía del Taller y Simposio “Estandarización y validación del uso clínico de la reacción en cadena de la polimerasa para detección de infección por *Trypanosoma cruzi*”.
87. Schmuñis, G. 2007. "Epidemiology of Chagas disease in non-endemic countries: the role of international migration. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. **102(1)**:75-85.
88. Silveira A. 2006. Factores de riesgos implicados en la transmisión oral de la Enfermedad de Chagas. En: Informe Final Consulta Técnica e Epidemiología, Prevención y Manejo de la Transmisión de la Enfermedad de Chagas como Enfermedad Transmitida por Alimentos (ETA); Rio de Janeiro. 16-9.
89. Tapia, V., Galdames, P., Ramírez, G. 2012. Mecanismos de evasión del sistema complemento utilizados por *Trypanosoma cruzi* Santa Rosa, Chile. *Avances en Ciencias Veterinarias*. **27(2)**: 10-19

90. Torrealba, J. F. 1935. La maladie de Chagas au Venezuela. Decouverte et Recherches dans la Region de Zaraza. Etat de Guarico. Investigaciones sobre la Enfermedad de Chagas en San Juan de los Morros. Estado Guárico, Venezuela. *Otras Notas Científicas. Recopilación*. Vargas. Caracas, Venezuela. **7**: 203-243.
91. Toso, A., Vial, F., Galanti, N., 2011. Transmision de la enfermedad de chagas por via oral. *Rev Med Chile*. **139**: 258-266. URL disponible en: <http://www.scielo.cl/pdf/rmc/v139n2/art17.pdf>. [Consulta: 26 de mayo de 2013].
92. Trillo, L., Garcés, J., Jarque, J, Gris, J. 2008. Enfermedad de Chagas: Una enfermedad emergente en nuestro medio. *Rev. Esp. Anestesiol. Reanim*. **55**: 525-526. URL disponible en: https://www.sedar.es/vieja/restringido/2008/n9_2008/1.pdf. [Consulta: 26 de Mayo de 2013].
93. Umezawa, E., Nascimento, M., Kesper, N., Coura J. R., Borges-Pereira J., Junqueira A. C., Camargo, M. E. 1996. Immunoblot assay using excreted-secret antigens of *Trypanosoma cruzi* in serodiagnosis of congenital, acute, and chronic Chagas disease. *J. Clin. Microbiol*. **34**: 2143-2147.
94. Urdaneta-Morales., S. 1988. Pleomorphism in Trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi* from Blood and Cell Culture. *Tropen med Parasit* **34**: 225-228.
95. Valente, S., Valente, V., Pinto, A. 2006. Epidemiologia e transmissão oral da doença de Chagas na Amazonia Brasileira. Instituto Evandro Chagas. Rodovia. In: Informe Final Consulta Técnica y Epidemiología, Prevención y Manejo de la Transmisión de la Enfermedad de Chagas como Enfermedad Transmitida por Alimentos (ETA); Rio de Janeiro. **1**:21-6.

96. Vallejo, G., Guhl, F., Carranza, J., Lozano, L., Sanchez, J., Jaramillo, J. Steindel, M. 2002. kDNA markers define two major *Trypanosoma rangeli* lineales in Latin-America. *Acta Tropica*, **81**: 77-82.
97. Voller, A., Bidwell, D., Bartlett, A., Fleck, D., Perkins, M., Oladehin, B. 1976. A microplate enzyme-immunoassay for *Toxoplasma* antibody. *J Clin Pathol.* **29**:150-153.
- 98.
99. Wendel, S., Brener, Z., Camargo, M., Rassi, A., 1992. Chagas Disease (American Trypanosomiasis): Its impact on transfusion and clinical medicine. Sociedade Brasileira de Hematologia e Hematoterapia. Sao Paulo, Brasil.
100. WHO. 2013. World Health Organization Global health atlas. URL disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/es/> [Consulta: 20 de Abril de 2013].
101. WHO. 2010. Chagas disease: control and elimination. Report by the Secretariat. URL disponible en: http://apps.who.int/gb/ebwha/pdf_files/WHA63/A63_17-en.pdf [Consulta: 20 de Abril de 2013].
102. Yoshida Nobuko. 2008. *Trypanosoma cruzi* infection by oral route. How interplay between parasite and host components modulates infectivity. *Parasitology International*. Sao Paulo, Brasil **57**: 105-109.
103. Yoshida Nobuko. 2009. Molecular mechanisms of *Trypanosoma cruzi* infection by oral route. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. Rio de Janeiro, Brasil **57**: 105-109.
104. Yoshida, N. 2009. Molecular mechanisms of *Trypanosoma cruzi* infection by oral route. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro. **104(1)**:101-107.

105. Zingales, B., Andrade, S., Briones, M., Campbell, D. A., Chiari, E. 2009. A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcIV. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. **104**:1051-1054.