

UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA
FACULTAD DE CIENCIAS
POSTGRADO EN ZOOLOGÍA



**Complejos ecopatogénicos de la Tripanosomiasis Americana en Venezuela:
Heterogeneidad de *Trypanosoma cruzi* (Kinetoplastida, Tripanosomatidae)**

Tesis Doctoral presentada ante la ilustre Universidad Central de Venezuela por la Licenciada Daisy Johana Lozano Arias, como requisito parcial para optar al título de Doctor en Ciencias, mención Zoología.

Tutores: Dra. Leidi Herrera Cabrera (IZET-UCV)
Dra. Elizabeth Ferrer (BIOMED-UC)

Caracas - Venezuela
Enero 2017



**UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA
FACULTAD DE CIENCIAS
COMISIÓN DE ESTUDIOS DE POSTGRADO**



Comisión de Estudios
de Postgrado

VEREDICTO

Quienes suscriben, miembros del jurado designado por el Consejo de la Facultad de Ciencias y el Consejo de Estudios de Postgrado de la Universidad Central de Venezuela, para examinar la **TESIS DOCTORAL** presentada por la **Lcda. DAISY JOHANA LOZANO ARIAS, P-41955643**, bajo el título "**COMPLEJOS ECOPATOGÉNICOS DE LA TRIPANOSOMIASIS AMERICANA EN VENEZUELA: HETEROGENEIDAD DE *TRYPANOSOMA CRUZI* (KINETOPLASTIDA, TRIPANOSOMATIDAE)**", a fin de cumplir con el requisito legal para optar al grado académico de **DOCTORA EN CIENCIAS**, Mención **ZOOLOGÍA**, dejan constancia de lo siguiente:

1.- Leído como fue dicho trabajo por cada uno de los miembros del jurado, se fijó el día 18 de enero de 2017, a las 10:00 a.m., para que la autora lo defendiera en forma pública, lo que esta hizo en la Sala Jesús María Pacheco del Instituto de Zoología y Ecología Tropical, Facultad de Ciencias, UCV, mediante un resumen oral de su contenido, luego de lo cual respondió satisfactoriamente a las preguntas que le fueron formuladas por el jurado, todo ello conforme con lo dispuesto en el Reglamento de Estudios de Postgrado vigente.

2.- Finalizada la defensa del trabajo, el jurado decidió **APROBARLO**, por considerar, sin hacerse solidario con las ideas expuestas por el autor, que se ajusta a lo dispuesto y exigido en el Reglamento de Estudios de Postgrado.

Para dar este veredicto, el jurado estimó que el trabajo examinado constituye un gran aporte multidisciplinario desde el punto de vista ecológico, biológico y epidemiológico para el conocimiento de la dinámica actual de la tripanosomiasis americana destacándose la predominancia de *P. geniculatus* y *T. maculata* como

[Handwritten signature]

[Handwritten signature]

[Handwritten signature]

[Handwritten signature]

[Handwritten signature]

vectores en algunas regiones en Venezuela y la aparición de *Ps. arturi* y *R. pictipes* infectados con *T. cruzi* en los ecotopos peridomésticos de la región Oriental de Venezuela. El registro de invasión de tejidos de mamíferos abre nuevas vías de investigación en el campo de la ecoepidemiología de la tripanosomiasis americana.

En fe de lo cual se levanta la presente ACTA, a los 18 días del mes de enero del año 2017, conforme a lo dispuesto en el Reglamento de Estudios de Postgrado, actuó como Coordinador del Jurado, la tutora del trabajo, Dra. Leidi Herrera.

El presente trabajo fue realizado bajo la dirección de la Dra. Leidi Herrera y la Dra. Elizabeth Ferrer (BIOMED-UCV).



Dra. Belkisyolé, Alarcón de Noya
IMT-UCV
Jurado designado por el Consejo
de la Facultad
C.I. 3.560.014



Dra. María Lorena, Marquez
IBE-UCV
Jurado designado por el Consejo
de la Facultad
C.I. 9.219.907



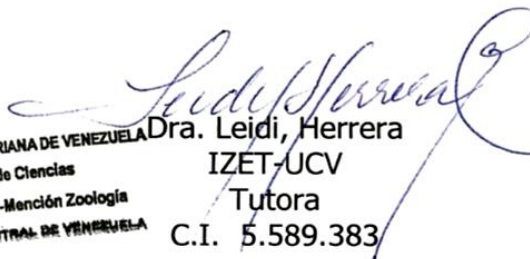
Dr. Alfredo, Mijares Rodríguez
CBB-IVIC
Jurado designado por el Consejo
de Estudios de Postgrado
C.I. 5.530.962



Dra. Domenica Carolina, Cannova
DP-UC
Jurado designado por el Consejo
de Estudios de Postgrado
C.I. 7.091.108



REPÚBLICA BOLIVARIANA DE VENEZUELA
Facultad de Ciencias
P-G en Ciencias -Mención Zoología
UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA



Dra. Leidi, Herrera
IZET-UCV
Tutora
C.I. 5.589.383



REPÚBLICA BOLIVARIANA DE VENEZUELA
Facultad de Ciencias
P-G en Ciencias -Mención Zoología
UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA

DEDICATORIA

A Dios y la virgen, por la vida

A mis padres, Orlando Lozano y Luz Stella Arias, por su amor, dedicación y perseverancia, por enseñarme que en la vida todo es posible con entrega y dedicación.

A mi abuela Emma, por ser esa voz amiga y alentadora que siempre me escucha y me llena de energía.

A mi familia, mi esposo Roberto José García y mi hijo Samuel Alejandro García Lozano, por todo el apoyo incondicional, por las largas noches de desvelos y por ser el motor de mi existir.

AGRADECIMIENTOS

En primera instancia, doy gracias a Dios y la Virgen por el don de la Vida y por estar a mi lado siempre.

A mis amados padres, Orlando Lozano y Luz Stella Arias, ejemplo de vida, por sus consejos y ganas de seguir luchando a pesar de los tropiezos; por ser la luz en el camino que me condujo a alcanzar este gran y anhelado sueño de ser Doctora, triunfo que ahora es de ustedes.

A mis dos grandes motivaciones de superación, mi hijo Samuel Alejandro García Lozano, por su desinteresado e incondicional amor, porque con sus besos, abrazos y locuras llena mi ser de esperanza y ganas de seguir luchando; mi esposo Roberto José García Alzate, por tantos años de compañía y apoyo, por sus consejos, palabras de aliento y ganas de luchar para construir una hermosa familia y un hogar ejemplar.

A mi hermosa abuela, Emma, por estar siempre conmigo con sus palabras de aliento y superación, por ser una bendición más en mi vida.

A mi hermana Leidi Yenihet Lozano y mi sobrina Kimey Perú Lozano, por hacer parte de mi vida y llenarla de alegrías.

A mis suegros Carlos Arturo García y Luz Stella Alzate, por su amor, paciencia y comprensión, gracias por ser mi segunda familia.

A mis cuñados, Carlos Arturo García, Luz Stella García, Sebastian Alzate y Angela Maria Valencia, por sus consejos y apoyo durante este largo caminar.

A mis compadres, Ingrid Rocio Fonseca y Jorge Luis Molina, por ser mis hermanos en este hermoso país, por darme el privilegio de ser la madrina de esos dos hermosos seres que Dios y la Virgen nos regaló, Isabella Maria y Angel Isaac. A sus padres el Sr. Luis Molina y Sra. Maria Guerra, por permitirme hacer parte de sus vidas y acompañarme durante este largo pero bello proceso de aprendizaje.

A los integrantes de la familia Mijares-Martínez, Sra Ramona, Mery, Mairelys y demás miembros de la familia, por su amor, paciencia, enseñanzas y por brindarme el calor de hogar que tanto necesite estando lejos de mi tierra natal.

A mi tutora Leidi Herrera, quien es mi segunda madre, amiga y guía en mi querida Venezuela, por todos sus consejos, asesorías, trasnochos, por ese gran amor que me brinda el cual me hace sentir que hago parte de su familia. Gracias por querer a mi hijo como su

nieto. Infinitas gracias por creer en mí en el momento que más lo necesitaba. Me quedo corta en palabras para expresar todo lo que siento, pero usted mejor que nadie me conoce, de nuevo gracias.

Al Sr. Carlos Matos, el viejito cascarrabias “jeje”, gracias por su tolerancia, amor, paciencia y cariño, por estar siempre presente cuando más lo necesite.

A las hermanas Torres, Isolia y Vestalia, por su apoyo y amistad.

A la Dra. Elizabeth Ferrer, mi segunda tutora, por su apoyo en el desarrollo de mis experimentos, elaboración de manuscritos, consejos y enseñanzas de vida. Gracias por permitirme hacer parte de esa gran familia llamada BIOMED, en especial a la Lic. Mercedes Viettri y a la Sra. María Lares.

Al Dr. Alexis Mendoza-León, por hacerme ver la vida desde otro punto vista, afrontando las penas siempre con una sonrisa, gracias por brindarme un espacio en su laboratorio, en su hogar y en su vida.

Al Dr. Servio Urdaneta, excelente profesor y maestro, gracias por enseñarme el hermoso mundo de los parásitos y por abrirme las puertas de su segundo hogar, el laboratorio de Biología de los Trypanosomatideos.

A la Dra. Lucrecia Contreras (CIET-UC) por su colaboración en la realización del material histológico y su asesoría en el análisis de los mismos.

A mis compañeros y amigos del Instituto de Zoología y Ecología Tropical (IZET-UCV); Sr. Miguel Gómez (†), Sra. Lisett Rangel, Sra. Carmen Luna, Sra Luz Dary Velázquez, Lic. Leonor Domínguez, Lic. Aldrich Ziegler, Sr. Marcos Caldera, a todos y cada uno gracias su dedicación, apoyo logístico, cariño, consejos y por estar siempre presentes sin importar la situación.

A mis colegas, compañeros de campo y amigos, que hicieron parte de los diferentes proyectos en los que participe, Dr. Antonio Morocoima (UDO), Dr. Matías Reyes (IMT-UCV), Dr. Raúl Espinosa (Medico Cardiólogo), MSc Tony Chacón (UCV-Facultad de Ciencias Veterinarias), Prof. José Alberto Sandia Mago (Medios Audiovisuales), Lic. Luis Villamizar (IBE-UCV), Sra. Marlene Rodríguez (IBE-UCV), Sr. José García (IBE-UCV), por el acompañamiento en el desarrollo de mi tesis y por todos los momentos compartidos.

A la Oficina de apoyo al investigador (OFAI-UCV): Lic. Alicia Barreto, Lic. Adriana, Lic. Rubén Mogollón, Lic. Elida Guerrero y de más miembros, por su gestión en la

administración de los proyectos, por el excelente desempeño de sus labores que permitieron un adecuado desarrollo de las actividades.

A todas las personas de las diferentes comunidades visitadas durante la fase de campo de la tesis, gracias por su atención, compromiso, acogimiento y colaboración en la colecta del material biológico.

A mis colegas del Instituto de Biología Experimental de la Universidad Central de Venezuela: Dra. Maira Oropeza, Lic. Felipe Sojo Longa, Dr. Héctor Blanco, Dra. María Carolina Pérez, Dra. Vincenza Cervino, Profa Merys Cassotto, Dra. Mighay Lovera, Profa Ángeles Zambrano, Profa Maria García, gracias por el apoyo, la asesoría, los conocimientos, las sugerencias y la solidaridad brindada.

A todos los miembros del laboratorio de Inmunología del Instituto de Medicina Tropical, Universidad Central de Venezuela, en especial a la Dra. Zoraida Díaz y Dra. Belkysyole Alarcón de Noya, por su asesoría y acompañamiento en la parte experimental.

A la Dra. Mercedes Salazar y Lic. Aida Llopis, miembros del postgrado en Zoología-UCV, por ser tan diligentes y estar siempre dispuestas a colaborar.

Al Dr. Roschman Gonzalez, profesor de la Facultad de Ciencias e Investigador del laboratorio de Microscopia Electronica (UCV) por la asesoría en el desarrollo estadístico de los resultados.

A mis colegas y amigos, del laboratorio de Biotecnología microbiana y bioprospección de la Universidad del Atlántico-Colombia, Dr. Jorge William Arboleda-Valencia, MsC. Roger Valle-Molinares y Dra. Melissa Eyes Escalante, por brindarme un espacio en su laboratorio y facilitarme los materiales y reactivos necesarios para culminar con la parte experimental de mi tesis.

A todos los miembros del Museo de Colecciones Biológicas de la Universidad del Atlántico-Colombia, por su paciencia, comprensión y cariño, además por brindarme un espacio para la elaboración del manuscrito de mi tesis.

A todas y cada una de aquellas personas que de una u otra manera, colocaron su granito de arena para que fuese posible alcanzar tan anhelado sueño, como es ser Doctora en Ciencias, mención Zoología de la Universidad Central de Venezuela.

FINANCIAMIENTO

El desarrollo de esta tesis doctoral fue posible gracias al financiamiento obtenido por:

Proyecto Estratégico del Ministerio de Ciencia, Tecnología e Innovación N° 2011000470. Titulado “EVALUACIÓN Y MEJORAMIENTO DE VIVIENDAS RURALES Y SUB URBANAS CON PARTICIPACIÓN COMUNITARIA PARA EL CONTROL Y LA PREVENCIÓN DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS EN VENEZUELA”.

Proyecto de Grupo CDCH-PG-03-8171-2011/1. Titulado “ESTUDIO DE LA VARIABILIDAD EN TRIATOMINOS VECTORES DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS EN VENEZUELA PROVENIENTES DE AREAS ENDÉMICAS”.

Proyecto Misión Ciencia N° 2008000911-6. Titulado “RESERVORIOS, VECTORES Y PARTICIPACIÓN CIUDADANA EN LAS ESTRATEGIAS DE PREVENCIÓN Y CONTROL DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS EN ÁREAS ENDÉMICAS DE VENEZUELA”

Así como por la infraestructura proporcionada por el “Laboratorio de Biología de Vectores y parásitos” adscrito al Instituto de Zoología y Ecología Tropical-Universidad Central de Venezuela y el “Laboratorio de Biología Molecular” adscrito al BIOMED de la Universidad de Carabobo-Venezuela.

RESUMEN

Trypanosoma cruzi, agente causal de la Tripanosomiasis Americana, ha sido reportado en 180 especies de mamíferos y 140 especies de triatominos del Neotrópico. Es un hemoflagelado clonal con comportamiento biológico variable, asociado con la composición genética del parásito y de sus hospedadores. Para conocer el complejo ecopatogénico de esta zoonosis, fue propuesta la caracterización biológica y genotípica de aislados de *T. cruzi* obtenidos de triatominos y mamíferos en ecótopos domésticos, peridomésticos y silvestres de las regiones Oriental y Centro-Occidental de Venezuela. Se estableció la positividad a *T. cruzi* y mediante modelo murino de baja virulencia fueron evaluados la cinética de infección y el parasitismo tisular de los aislados. Dichos aislados fueron caracterizados genotípicamente mediante amplificación por PCR del gen mini-exón, del ADN codificante del ARNr 24S α y 18S, y de secuencias polimórficas-RFLPs. Un total de 460 hospedadores fueron muestreados, de los cuales 205 correspondieron a triatominos y 255 a mamíferos, el 49% de los aislados presentaron positividad para el parásito, siendo evaluados en modelo murino 38 aislados obtenidos de los triatominos: *Triatoma maculata*, *Rhodnius prolixus*, *Panstrongylus geniculatus*, *Rhodnius pictipes*, *Psanmolestes arthuri* y *Eratyrus cuspidatus* y 23 aislados obtenidos de los mamíferos: *Didelphis marsupialis*, *Pecari tajacu*, *Odocoileus margaritae*, *Rattus rattus*, *Cerdocyon thous*, *Equus asinus* y *Desmodus rotundus*. En promedio los aislados de triatominos tuvieron un periodo prepatente-PP de 14 días, periodo de infección patente-PIP de 18 días, máxima parasitemia-MP de $24,17 \times 10^4$ trip/ml sangre y 67% de mortalidad; mientras que para los aislados de mamíferos el PP fue de 14 días, PIP de 20 días, MP de $7,0 \times 10^4$ trip/ml sangre y 69% de mortalidad, siendo los aislados de triatominos los más virulentos. Un total de 9 tejidos tales como bazo, cerebro, corazón, hígado, intestino delgado, músculo esquelético, páncreas, pulmón y riñón, fueron invadidos por el parásito con intensidad variable, sin embargo la mayoría de los aislados presentaron gran afinidad por los tejidos muscular esquelético y cardiaco. Los aislados de *T. cruzi* mostraron variabilidad en el comportamiento biológico tanto en la cinética de infección como en el parasitismo tisular, con mayor similitud entre los aislados provenientes del mismo tipo de fuente hospedadora independientemente de la región geográfica o ecótopo, aún cuando estadísticamente el único parámetro que presentó diferencias significativas fue MP. El genotipo TcI predominó en la mayoría de los aislados, sin embargo, en los aislados de triatominos se evidencio también el genotipo TcIII en infecciones únicas y mixtas (TcI+TcIII), al igual que el genotipo TcIV con infección mixta (TcI+TcIV), lo cual podría abrir la posibilidad de que estos genotipos asociados en nuestro estudio exclusivamente con los triatominos, dispersores que actúan como “jeringas biológicas”, puedan estar relacionados con diferentes manifestaciones clínicas de la parasitosis. La caracterización biológica y genotípica en forma simultánea de aislados de *T. cruzi* obtenidos de hospedadores usualmente no considerados en otros estudios en Venezuela, permiten ampliar los conocimientos del complejo ecopatogénico y la transmisibilidad del parásito. La heterogeneidad biológica y genotípica en los aislados de *T. cruzi* demostró la complejidad de la parasitosis en estas regiones, presentando como un reto su control y prevención, ya que no fue posible establecer en forma determinante una relación entre comportamiento biológico, fuente del aislado, región geográfica y genotipo.

Palabras claves: *Trypanosoma cruzi*, cinética de infección, genotipo, heterogeneidad, hospedadores.

ABSTRACT

Trypanosoma cruzi, causal agent of the American Tripanosomiasis, has been reported in 180 species of mammals and 140 species of triatomines in the Neotropic. It is a clonal hemoflagellate with variable biological behavior, associated with the genetic composition of parasite and its hosts. In order to know the ecopathogenic complex of this zoonosis, it was proposed the biological and genotypic characterization of isolates of *T. cruzi* obtained from triatomines and mammals in domestic, peridomestic and wild ecotopes from Eastern and Central West regions of Venezuela. It was established positivity to *T. cruzi* and evaluated the kinetics of infection and tissue parasitism of the isolates in murine model of low virulence. These isolates were characterized genotypically by PCR amplification of mini-exon gene, DNA encoding the 24S α and 18S rRNA fractions and polymorphic sequences-RFLPs. A total of 460 hosts were sampled, of which 205 were triatomines and 255 mammals, 49% of the isolates were positive for the parasite, being evaluated in murine model 38 isolates obtained from triatomines: *Triatoma maculata*, *Rhodnius prolixus*, *Panstrongylus geniculatus*, *Rhodnius pictipes*, *Psanmolestes arthuri* and *Eratyrus cuspidatus* and 23 isolates obtained from mammals *Didelphis marsupialis*, *Pecari tajacu*, *Odocoileus margaritae*, *Rattus rattus*, *Cerdocyon thous*, *Equus asinus* and *Desmodus rotundus*. The triatomines isolates had mean prepatent period-PP of 14 days, patent period infection-PIP of 18 days, maximum parasitemia-MP 24,17x10⁴ trip/ml blood and 67% of mortality, while for isolated of mammalian PP was 14 days, 20 days PIP, MP of 7,0 x10⁴ trip/ml blood and 69% mortality, being triatomine isolates the most virulent. A total of 9 tissues, such as, as spleen, brain, heart, liver, thin intestine, skeletal muscle, pancreas, lung and kidney, were colonized for the parasite with variable intensity; however most of the isolates showed high affinity for heart and skeletal muscle. The isolates of *T. cruzi* showed variability in the biological behavior, both the kinetics of infection and tissue parasitism, with greater similarity between isolates from the same type of host source regardless of the geographic region or ecotope, even though statistically the only parameter that was significantly different was MP. TcI genotype predominated in most of the isolates, however, in isolated of triatomine was also evidenced the genotype TcIII in single and mixed infection (TcI+TcIII), and the TcIV genotype with mixed infection (TcI+TcIV) was also obtained, which could open the possibility that these genotypes associated in our study exclusively with the triatomine, dispersers that act as “biological syringes”, can be associated with different clinical manifestations of the parasitosis. Simultaneous biological and genotypic characterization of *T. cruzi* isolates from host has not usually considered in other studies in Venezuela, in this study increase the knowledge of this ecopathogenic complex and transmissibility of the parasite. The biological and genotypic heterogeneity found among the *T. cruzi* isolates demonstrated the complexity of the parasitosis in these regions, a challenge to its control and prevention since it has not been possible to establish a relationship between biological behavior, isolated source, geographic region and genotype.

Keywords: *Trypanosoma cruzi*, kinetics of infection, genotype, heterogeneity, hosts.

INDICE DE CONTENIDO

	Página
1. Introducción	1
2. Marco teórico	2
2.1. <i>Trypanosoma cruzi</i>	2
2.2. Hospedadores de <i>Trypanosoma cruzi</i>	4
2.2.1 Triatominos	4
2.2.2. Mamíferos	6
2.3. Modalidades de los ciclos de transmisión de <i>Trypanosoma cruzi</i>	7
2.4. Heterogeneidad de <i>Trypanosoma cruzi</i>	9
2.5. Histotropismo de <i>Trypanosoma cruzi</i>	14
2.6 Tripanosomiasis Americana o Enfermedad de Chagas.	16
2.7. Situación de la Tripanosomiasis Americana en Venezuela.	18
3. Hipótesis de trabajo	21
4. Justificación	21
5. Objetivos	22
5.1. Objetivo General	22
5.2. Objetivos específicos	22
6. Marco Metodológico	23
6.1. Área de estudio	23
6.2. Muestreo de los hospedadores (Triatominos y Mamíferos)	27
6.2.1. Muestreo de triatominos	27
6.2.2. Muestreo de mamíferos	30
6.3. Determinación de infección y aislamiento de los parásitos.	33

6.4. Caracterización biológica de los aislados de <i>Trypanosoma cruzi</i>	33
6.5. Estudio del parasitismo tisular	35
6.6. Caracterización genotípica de los aislados de <i>Trypanosoma cruzi</i>	35
6.6.1. Extracción de ADN	35
6.6.2. Evaluación de integridad y cuantificación del ADN	36
6.6.3. Diagnóstico molecular	37
6.6.4. Marcadores moleculares de variabilidad genética.	37
6.6.5. Verificación de los productos de PCR.	40
6.7. Análisis estadístico	41
7. Resultados	42
7.1. Estudio de Hospedadores y su positividad a <i>Trypanosoma cruzi</i>	42
7.1.1. Triatominos	42
7.1.2. Mamíferos	44
7.2. Caracterización biológica de los aislados de <i>Trypanosoma cruzi</i>	47
7.2.1. Aislados de Triatominos.	47
7.2.2. Aislados de Mamíferos	52
7.3. Parasitismo tisular	56
7.4. Análisis integrado del comportamiento biológico de los aislados de <i>Trypanosoma cruzi</i>	62
7.5. Caracterización genotípica de los aislados de <i>Trypanosoma cruzi</i> obtenidos de triatominos y mamíferos	66
7.5.1. Extracción y cuantificación del ADN	66
7.5.2. Diagnóstico molecular	67
7.5.3. Estudio de la variabilidad genética.	68
7.5.3.1. Amplificación del espaciador no transcrito del gen del mini-exón:	69

7.5.3.2. Amplificación de las regiones codificantes para la subunidad grande (24S α rDNA) del ADN ribosomal	72
7.5.3.3. Amplificación de las regiones codificantes para la subunidad pequeña (18S rDNA) del ADN ribosomal:	74
7.5.3.4. Análisis de los polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción (RFLPs)	76
7.6. Distribución geográfica de los componentes del complejo ecopatogénico de <i>Trypanosoma cruzi</i> en Venezuela.	81
8. Discusión	83
9. Conclusiones	96
10. Recomendaciones	97
11. Bibliografía	98
12. Anexos	110

INDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Ciclo de vida del <i>Trypanosoma cruzi</i> .	4
Figura 2. Modalidades y relaciones entre los ciclos de transmisión de <i>Trypanosoma cruzi</i> .	8
Figura 3. Distribución geográfica de los genotipos de <i>Trypanosoma cruzi</i> en las Américas.	12
Figura 4. Modelo de histotropismo clonal de la Enfermedad de Chagas.	15
Figura 5. Distribución geográfica de la Tripanosomiasis Americana en el mundo.	17
Figura 6. Distribución geográfica de la Tripanosomiasis Americana en Venezuela.	19
Figura 7. Área de estudio.	23
Figura 8. Búsqueda activa de triatominos.	29
Figura 9. Búsqueda pasiva de triatominos.	30
Figura 10. Tipos de trampas para captura de mamíferos en campo.	31
Figura 11. Fotografías de las especies de triatominos encontrados en las regiones Oriental y Centro-Occidental de Venezuela.	43
Figura 12. Fotografías de algunas especies de mamíferos encontrados en las regiones Oriental y Centro-Occidental de Venezuela.	46
Figura 13. Evaluación de los parámetros de infección mediante diagrama de cajas (<i>box plot</i>) de los aislados de <i>Trypanosoma cruzi</i> obtenidos de triatominos en las regiones Oriental y Centro-Occidental de Venezuela.	51
Figura 14. Evaluación de los parámetros de infección mediante diagrama de cajas (<i>box plot</i>) de los aislados de <i>Trypanosoma cruzi</i> obtenidos de mamíferos en las regiones Oriental y Centro-Occidental de Venezuela.	55
Figura 15. Evaluación comparativa de los parámetro de infección mediante diagrama de cajas (<i>box plot</i>) de los aislados de <i>Trypanosoma cruzi</i> obtenidos de triatominos y mamíferos en las regiones Oriental y Centro-Occidental de Venezuela.	56
Figura 16. Microfotografías de secciones histológicas de ratones NMRI infectados experimentalmente con aislados de <i>Trypanosoma cruzi</i> obtenidos de triatominos y mamíferos en las regiones Oriental y Centro-Occidental de Venezuela.	60
Figura 17. Análisis de componentes principales (ACP) integrando los parámetros del comportamiento biológico de los aislados de <i>Trypanosoma cruzi</i> provenientes de	64

triatominos y mamíferos de Venezuela

Figura 18. Análisis de componentes principales (ACP) evaluando los parámetros del comportamiento biológico de los aislados de <i>Trypanosoma cruzi</i> combinando CP1, CP2 y CP3.	65
Figura 19. Análisis de conglomerado (UPGMA) de los parámetros del comportamiento biológico de los aislados de <i>Trypanosoma cruzi</i> en Venezuela	66
Figura 20. Gel de integridad del ADN genómico de los aislados de <i>Trypanosoma cruzi</i> .	67
Figura 21. Amplificación del ADN del kinetoplasto (kDNA) de los aislados de <i>Trypanosoma cruzi</i> obtenidos de triatominos y mamíferos en las regiones Oriental y Centro-Occidental de Venezuela.	68
Figura 22. Amplificación del espaciador no transcrito del gen del mini-exón de los aislados de <i>Trypanosoma cruzi</i> obtenidos de triatominos y mamíferos en las regiones Oriental y Centro-Occidental de Venezuela.	71
Figura 23. Amplificación de la subunidad 24Sα del ADN ribosomal en los aislados de <i>Trypanosoma cruzi</i> obtenidos de triatominos y mamíferos en las regiones Oriental y Centro-Occidental de Venezuela.	73
Figura 24. Amplificación de la subunidad 18S del ADN ribosomal de los aislados de <i>Trypanosoma cruzi</i> obtenidos de triatominos y mamíferos en las regiones Oriental y Centro-Occidental de Venezuela. .	75
Figura 25. Perfiles de los haplotipos obtenidos mediante el análisis de los polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción (PCR-RFLPs) de aislados de <i>Trypanosoma cruzi</i> provenientes de triatominos en las regiones Oriental y Centro-Occidental de Venezuela.	78
Figura 26. Perfiles de los haplotipos obtenidos mediante el análisis de los polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción (PCR-RFLPs) de aislados de <i>Trypanosoma cruzi</i> provenientes de mamíferos en las regiones Oriental y Centro-Occidental de Venezuela.	80
Figura 27. Distribución geográfica de los componentes del complejo ecopatogénico de la Tripanosomiasis Americana en Venezuela.	82

INDICE DE TABLAS

	Página
Tabla 1. Regiones geográficas, localidades y coordenadas de las áreas de estudio.	26
Tabla 2. Marcadores moleculares de variabilidad genética.	38
Tabla 3. Patrón de bandas en pares de bases de los genotipos de <i>Trypanosoma cruzi</i> establecidos mediante ensayos de PCR-RFLP.	40
Tabla 4. Diversidad de especies de triatominos muestreados en las regiones Oriental y Centro-Occidental de Venezuela y su positividad para <i>Trypanosoma cruzi</i> .	43
Tabla 5. Diversidad de las especies de mamíferos muestreados en las regiones Oriental y Centro-Occidental de Venezuela y su positividad para <i>Trypanosoma cruzi</i> .	45
Tabla 6. Parámetros de la cinética de infección evaluados en modelo murino (NMRI) de los aislados de <i>Trypanosoma cruzi</i> , obtenidos de triatominos en las regiones Oriental y Centro-Occidental de Venezuela.	48
Tabla 7. Parámetros de la cinética de infección evaluados en modelo murino (NMRI) de los aislados de <i>Trypanosoma cruzi</i> , obtenidos de mamíferos en las regiones Oriental y Centro-Occidental de Venezuela.	53
Tabla 8. Parasitismo tisular e intensidad de invasión causada por los aislados de <i>Trypanosoma cruzi</i> en ratones NMRI infectados experimentalmente.	57
Tabla 9. Valores de Covarianza para el análisis integrado de los parámetros del comportamiento biológico de los aislados de <i>Trypanosoma cruzi</i> obtenidos de triatominos y mamíferos en las regiones Oriental y Centro-Occidental de Venezuela.	63
Tabla 10. Caracterización genotípica de los aislados de <i>Trypanosoma cruzi</i> circulantes en triatominos de las regiones Oriental y Centro-Occidental de Venezuela.	70
Tabla 11. Caracterización genotípica de los aislados de <i>Trypanosoma cruzi</i> circulantes en mamíferos de las regiones Oriental y Centro-Occidental de Venezuela.	72
Tabla 12. Haplotipos de <i>Trypanosoma cruzi</i> circulantes en triatominos de las regiones Oriental y Centro-Occidental de Venezuela, establecidos mediante ensayos de PCR-RFLP.	77
Tabla 13. Haplotipos de <i>Trypanosoma cruzi</i> circulantes en mamíferos de las regiones Oriental y Centro-Occidental de Venezuela, establecidos mediante ensayos de PCR-RFLP.	79

LISTA DE ABREVIATURAS

ADN: Acido desoxirribonucleico

CO: Centro-Occidental

D: Doméstico

dNTPs: Dideoxinucleótidos trifosfato

DO: Densidad Óptica

EC: Ecótopo

ECh: Enfermedad de Chagas

FI: Fuente de inóculo

Flag: flagelados

GPI: Glicoproteína de superficie

H/E: Hematoxilina/Eosina

H1: Histona 1

HPS60: Proteína de choque térmico 60

m: metros

Ma: Millones de años

ml: mililitro

mM: milimolar

MP: Máxima Parasitemia

MT: Método

NaCl: Cloruro de Sodio

nm: nanómetros

ORT: Oriental

pb: Pares de bases

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

PD: Peridoméstico

PIP: Periodo de infección patente

PP: Periodo prepatente

rDNA: Acido desoxirribonucleico ribosomal

RFLP: Polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción

RG: Región Geográfica

rpm: revoluciones por minuto

S: Silvestre

SD: Desviación estándar.

SX: Sexo

TA: Tripanosomiasis Americana

TAE: Tampón Tris-acetato

TE:Tris EDTA (solución de rehidratación)

UV: Ultravioleta

%M: porcentaje de mortalidad

µl: microlitro

1. INTRODUCCIÓN

Trypanosoma cruzi (Eucarya, Kinetoplastea, Trypanosomatidae), agente causal de la Tripanosomosis Americana (TA) ó Enfermedad de Chagas (ECh), es un hemoflagelado heteroxénico, de naturaleza clonal, constituido por subpoblaciones del parásito responsables de la variabilidad en el curso de la infección, respuesta inmunológica y parasitismo tisular y en la complejidad en el ciclo de transmisión, lo cual lleva a la necesaria revisión de la clasificación del parásito, condición necesaria para su estudio y control (Guzmán-Marín y col., 1999; Brener y col., 2000; Carrasco y col., 2012).

La transmisión de *T. cruzi* en la naturaleza, es un proceso complejo y en ocasiones cada nicho que ocupa el parásito y sus interrelaciones con los hospedadores son eventos únicos en diferentes ambientes aún en los antropizados (Jansen y col., 1999; Brener y col., 2000).

El ciclo de vida del parásito se desarrolla exclusivamente en mamíferos de hasta diez órdenes y en aproximadamente 140 de especies de insectos hematófagos (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae), siendo las de mayor importancia epidemiológica para Venezuela las pertenecientes a los géneros *Triatoma*, *Rhodnius* y *Panstrongylus* (Herrera, 2010).

La TA ó ECh, es una de las parasitosis más importantes de América, constituyendo la cuarta causa de morbilidad y mortalidad en el continente, con un rango de distribución que va desde el Centro-Sur de los Estados Unidos hasta Chile y Argentina. En las últimas décadas se ha observado una frecuencia creciente de casos en Canadá, algunos países europeos y del Pacífico Occidental, lo cual podría ser explicado por las migraciones humanas desde América Latina al resto del mundo. Se considera que la ECh afecta a 21 países latinoamericanos, en los cuales 7 millones de personas están infectadas y 25 millones en riesgo de adquirir la infección (WHO 2016).

La alteración de los focos enzoóticos de la TA por el hombre, la incorporación de triatominos a las viviendas humanas, la domesticación y manejo de mamíferos silvestres y sinantrópicos unido a modificaciones en los sistemas de iluminación, los cuales pueden resultar atractivos a los triatominos, han favorecido el establecimiento de la zoonosis en diferentes ambientes (Haydon y col., 2002; Herrera, 2010).

Las parasitosis, como la TA, pueden ser consideradas como un conjunto biológico estable y localizado, influenciado por factores epidemiológicos, bioecológicos y socioeconómicos de la población humana y su interacción con otros grupos de animales, constituyendo así un complejo ecopatogénico, que puede ser abordado desde el punto de vista sistémico (Pickenhayn y col., 2008).

En este trabajo se propuso estudiar la heterogeneidad a nivel biológico y genotípico de aislados de *T. cruzi* obtenidos de triatomíneos y mamíferos, en localidades de las regiones Oriental y Centro-Occidental de Venezuela en donde habían sido reportado previamente casos de la parasitosis, teniendo en cuenta el contexto de cada ciclo de transmisión, y así obtener conocimiento de los posibles complejos, lo cual contribuiría a evaluar condiciones de riesgo y aportaría elementos para las estrategias de prevención y control.

2. MARCO TEÓRICO

2.1. *Trypanosoma cruzi*

Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi, surgió hace más de 150 millones de años en América y probablemente su primer contacto con el hombre ocurrió 15.000 años atrás. Este hemoflagelado está constituido por un conjunto de subpoblaciones del parásito, con diferentes características biológicas, bioquímicas y moleculares, las cuales circulan en ciclos domésticos, peridomésticos y silvestres en hospedadores mamíferos (incluyendo al humano) y en insectos vectores (Souto y col., 1996).

El parásito en su ciclo de vida presenta varios estadios polimórficos: los amastigotes o micromastigotes (con microflagelo evidente a nivel ultraestructural), con capacidad replicativa intracelular en el hospedador mamífero; los epimastigotes, morfotipo no infectivo, exclusivamente replicativo, presente en el lumen intestinal del vector y los tripomastigotes (sanguícola o metacíclico), morfotipo infectivo para el mamífero, sin capacidad replicativa.

Los tripomastigotes sanguícolas presentan variaciones hacia formas delgadas, anchas y muy anchas (pleomorfismo) descrito en modelos murinos, cuya aparición durante la parasitemia permite reconocer la fase de la infección. Así, los tripomastigotes delgados son

los más abundantes al inicio, mientras que en la medida en que se avanza hacia lo que pudiese ser análogo a una fase aguda, aparecerían los tripomastigotes anchos propios de una infección que está entrando en fase crónica (Urdaneta-Morales, 1983; Brener y col, 2000; Rimoldi y col., 2012).

Cuando un triatomino infectado se alimenta sobre un hospedador mamífero, los tripomastigotes metacíclicos en las heces u orina del vector son vertidos con el reflejo de defecación, ingresan al torrente sanguíneo del mamífero a través de pequeñas heridas o mucosas intactas e invaden macrófagos o fibroblastos, en los cuales se diferencian hacia amastigotes multiplicativos y posteriormente a tripomastigotes, estos últimos al ser liberados al torrente sanguíneo (tripomastigotes sanguícolas) o al espacio intercelular por propia acción del parásito o por lisis mecánica de la célula hospedadora, pueden reinvasar otras células y generar una dispersión a distancia del parasitismo o bien quedar circulando en sangre, pudiendo ser tomados nuevamente por el mismo triatomino u otro que participe en la trama trófica (Lenzi y col., 1996; de Sousa, 1999; Figura 1).

Cuando el triatomino ingiere a los tripomastigotes sanguícolas, estos viajan hacia el tracto digestivo del insecto, en el cual se diferencian en epimastigotes y migran hacia los túbulos de Malpighi, en donde se diferencian en tripomastigotes metacíclicos (formas infectantes para el mamífero) y son expulsados con las heces, cerrándose así el ciclo de transmisión (Tyler y Engman, 2001).

Una variante particular es la que se da en las glándulas anales de mamíferos didelfideos de antigua asociación con el parásito, en las cuales se encuentran todos los estadios polimórficos, en condiciones metabólicas y de temperatura similares a las presentadas en el vector, lo cual ha favorecido un doble ciclo, el sistémico (en sangre) y el glandular, lo cual ha permitido que los didelfideos actúen como vectores y reservorios al mismo tiempo (Herrera y Urdaneta-Morales, 2001; García-Más y col., 2008).

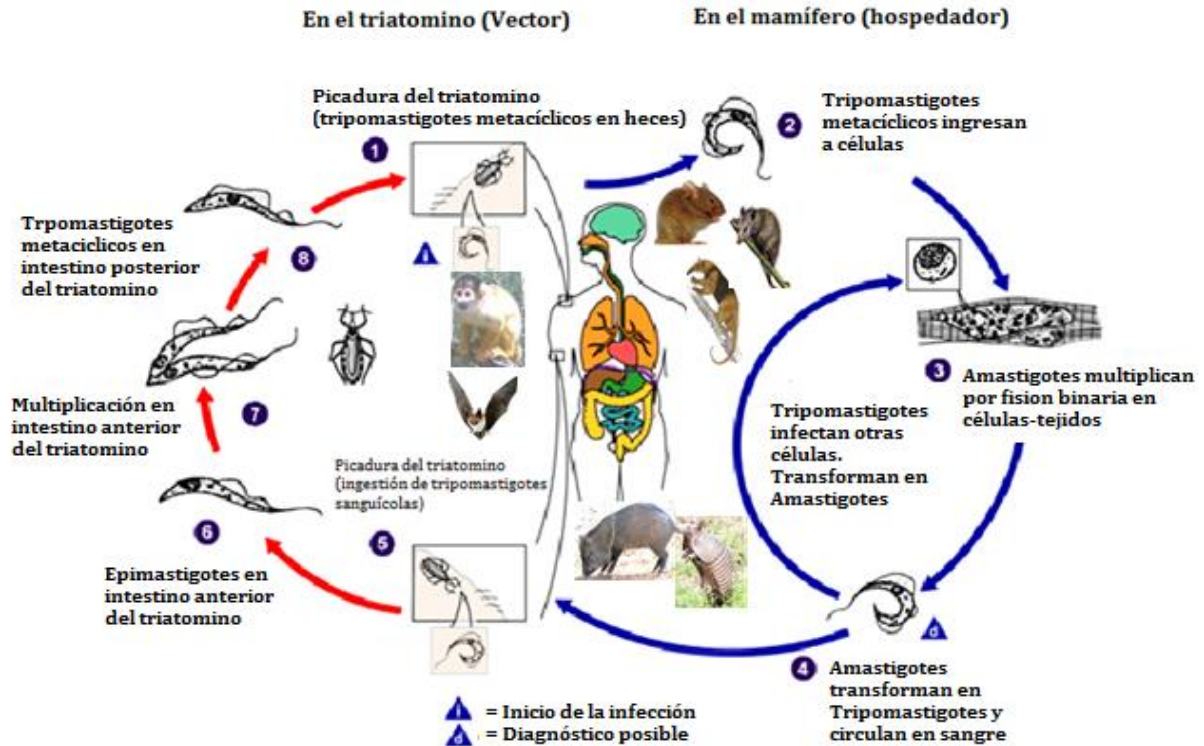


Figura 1. Ciclo de vida de *Trypanosoma cruzi*.

Modificado de <http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/TrypanosomiasisAmerican.htm>

2.2. Hospedadores de *Trypanosoma cruzi*

2.2.1. Triatominos

T. cruzi es transmitido por insectos hemimetábolos, considerados hasta ahora hematófagos estrictos (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae), de hábitos vespertinos o nocturnos, los cuales presentan siete estadios ontogénicos que van desde huevo, pasando por cinco estadios ninfales hasta adulto (Brener y col., 2000; Cazorla-Perfetti y Nives-Blanco, 2010).

Los triatominos se distribuyen casi exclusivamente en el continente americano, entre los 42° N y 46° S, con gran eclecticismo en el nicho ecológico, lo cual les permite ocupar todos los pisos térmicos, desde las llanuras hasta regiones montañosas de 2.000 m.s.n.m (predominantemente entre los 400 y 1200 m.s.n.m), con características climáticas y de vegetación, propias del clima tropical y subtropical (Carcavallo y col., 1999; Brener y col., 2000). Sin embargo, también se han reportado triatominos en el continente asiático,

representados por el género *Triatoma* (*T. rufrofasciata*) y específicamente en la India, por especies del género *Lyschosteus* (*L. kali* *L. chota* *L. cofuus* *L. carife* *L. costalis*; Dujardin y col. 2002).

La mayoría de las especies de triatominos son silvestres y transmiten el parásito a mamíferos hospedadores asociados con ecótopos silvestres, sin embargo, se ha planteado que algunos vectores pueden colonizar ecótopos domésticos y peridomésticos; es por ello que el desplazamiento de las especies silvestres a las viviendas humanas representa un riesgo potencial de transmisión (Carcavallo y col., 1999; Brener y col., 2000; Vallejo y col., 2009).

A nivel mundial han sido reportadas 140 especies de triatominos, distribuidos en 8 tribus y 15 géneros, sin embargo, las especies consideradas como vectores de *T. cruzi* para América Latina son las pertenecientes a las tribus Triatomini y Rhodniini, entre las cuales se encuentran: *Rhodnius prolixus*, *Rhodnius pallescens*, *Rhodnius ecuadoriensis*, *Rhodnius neglectus*, *Rhodniusstali*, *Rhodnius robustus*, *Rhodnius pictipes*, *Rhodnius brethesi*, *Triatoma barberi*, *Triatoma infestans*, *Triatoma dimidiata*, *Triatoma brasiliensis*, *Triatoma maculata*, *Triatoma nítida*, *Triatoma phyllosoma*, *Triatoma venosa*, *Triatoma carrioni*, *Triatoma sordida*, *Triatoma ryckmani*, *Panstrongylus herreri*, *Panstrongylus chinai*, *Panstrongylus megistus*, *Panstrongylus geniculatus* y *Panstrongylus rufotuberculatus*, distribuidas desde México hasta Argentina y Chile; sin embargo, algunas de estas especies silvestres también han sido reportadas desde el sur de Estados Unidos hasta la Patagonia-Argentina (Schofield y Galvão, 2009; Vallejo y col., 2009; Telleria y Tibayrenc, 2010).

En Venezuela se han reportado 22 especies de triatominos con capacidad vectorial para *T. cruzi*, agrupados en 9 géneros *Alberprosenia*, *Belminus*, *Cavernicola*, *Eratyrus*, *Microtriatoma*, *Panstrongylus*, *Psammolestes*, *Rhodnius* y *Triatoma* (Soto-Vivas, 2009; Cazorla-Perfetti y Nieves-Blanco, 2010). No obstante, los géneros de mayor importancia epidemiológica en Venezuela han sido *Rhodnius*, *Triatoma* y *Panstrongylus*, los cuales incluyen las especies *Rhodnius prolixus*, considerado hasta ahora, el principal vector en el país por su alta capacidad de domiciliación y proliferación; *Triatoma maculata* calificado como vector ocasional del peridomicilio y *Panstrongylus geniculatus* considerado hasta ahora como un vector preponderantemente silvestre. Es importante destacar que estas dos

últimas especies, han incursionado recientemente en el domicilio en condiciones de simpatria, reportándose la presencia de todos los estadios ontogénicos en las viviendas, lo que podría estar indicando una posible domiciliación (Reyes-Lugo y Rodríguez-Acosta, 2000; Feliciangeli y col., 2004; Morocoima y col., 2008; Morocoima y col., 2010a; Reyes-Lugo, 2009; García y col., 2011; García-Alzate y col., 2014).

2.2.2. Mamíferos

T. cruzi es exclusivo de hospedadores mamíferos incluyendo al hombre, reportándose infectadas 180 especies dentro de los órdenes Arthiodactyla, Carnivora, Cingulata, Chiroptera, Didelphidomorphia, Lagomorpha, Perisodactyla, Pilosa, Primates y Rodentia (Herrera, 2010).

Vertebrados de hábitos terrestres o semi acuáticos como aves y reptiles, pueden suplir las necesidades alimenticias de los triatominos cuando estos se encuentran en condiciones de estrés alimenticio. Ocasionalmente se han encontrado hemoflagelados compatibles morfológicamente con *T. cruzi*, con infecciones parasitarias transitorias, sin culminación exitosa del ciclo, por lo que se les considera refractarios al parásito, con tránsito efímero limitado por fluctuaciones de la temperatura sistémica, incompatibilidad antigénica o bien a la ausencia de reconocimiento y señalización celular parásito-hospedador. Estas interacciones abren la frontera hacia una biocenosis con potenciales procesos evolutivos que no han sido considerados hasta el momento (Urdaneta-Morales y Mc Lure, 1981; Herrera, 2010; Reyes-Lugo y col., 2011).

Uno de los reservorios de mayor importancia epidemiológica, es *Didelphis marsupialis*, por ser un hospedador muy antiguo y con amplia distribución geográfica en el Neotrópico. Este mamífero posee un micro ambiente corporal adecuado (sus glándulas anales) para la proliferación del parásito en todos sus estadios, incluyendo los tripomastigotes metacíclicos, haciendo prescindible la presencia de un insecto vector, lo cual explicaría la existencia de la parasitosis en ecótopos carentes de triatominos (Herrera y Urdaneta-Morales, 2001).

El hombre como último eslabón de la escala zoológica, participa en el ciclo de transmisión de *T. cruzi* como un hospedador accidental; el desequilibrio ecológico que

genera la intervención antrópica, ha llevado a la domiciliación de triatomíneos y mamíferos infectados, aumentando así el riesgo de la zoonosis (Herrera y Urdaneta-Morales, 2001; Herrera, 2010).

2.3. Modalidades de los ciclos de transmisión de *Trypanosoma cruzi*

La mayoría de las parasitosis, son descritas como enzootias restringidas a los animales silvestres, sin embargo algunas de estas han pasado a ser zoonosis por la integración del hombre y animales domésticos o sinantrópicos a la cadena de transmisión (Brener y col., 2000).

La TA ha sido considerada una zoonosis de naturaleza nidal, con focos naturales de infección y características de paisaje bien definidas, que podrían ser bioindicadores potenciales de la parasitosis, condicionados por el clima, relieve, suelo, geomorfología, flora y fauna. Los ecótopos pueden ser desde un foco pequeño y localizado (cuevas o madrigueras de mamíferos y vectores) hasta uno extenso y difuso (bosque o llanura). Dicha diversidad garantiza la transmisión del parásito independientemente de la presencia del hombre y animales domésticos o domiciliados; es por ello que los cambios en los ecótopos naturales de esta parasitosis, podrían explicar la ocurrencia de las “enfermedades emergentes” (Pavlosvsky, 1966; Romaña y col., 1999; Herrera y col., 2007).

Algunos autores han planteado que la TA no sólo debe describirse como una zoonosis, puesto que puede derivarse hacia una zooantroponosis ó antroponosis estricta, dependiendo de los elementos del ciclo de transmisión presentes y los mecanismos de transmisión actuantes (Zeledón, 1974; Zingales y col., 1998; Briceño- León, 2009; Herrera, 2014; Figura 2), los cuales son descritos de la siguiente manera:

- **Ciclo silvestre:** verdadera enzootia, en donde el parásito circula entre mamíferos silvestres y vectores que comparten sus ecótopos, siendo poco frecuente o casi inexistente la presencia del hombre. *Rhodnius prolixus*, *Triatoma maculata* y *Panstrongylus geniculatus* participan en este ciclo en Venezuela.
- **Ciclo Doméstico:** el parásito circula entre los hospedadores humanos y mamíferos domésticos, peridomésticos o sinantrópicos que están en contacto directo con el vector domiciliado en viviendas rurales o zonas periurbanas. *R. prolixus* es el vector más frecuente

en este ciclo de transmisión en Venezuela, sin embargo, *P. geniculatus*, *P. rufotuberculatus*, *T. maculata* e inclusive especies del género *Eratyrus* están colonizando cada vez más las viviendas urbanas en el país, por lo que ocasionalmente están siendo parte de este ciclo (Reyes-Lugo y Rodríguez-Acosta, 2000; Morocoima y col., 2010^b, 2012; García-Alzate y col., 2014).

➤ **Ciclo peridoméstico:** se presenta en los anexos del domicilio, conectando el ciclo silvestre y el doméstico, con la participación de mamíferos domésticos y triatominos en proceso de domiciliación que ingresan en las viviendas en busca de fuente sanguínea. Siendo *T. maculata* y *P. geniculatus* las especies de triatominos que participan con mayor frecuencia en este ciclo en Venezuela. Adicionalmente, algunos autores han reportado la presencia de *Psanmolestes arthuri* en este ciclo (Cruz-Guzmán y col., 2014).

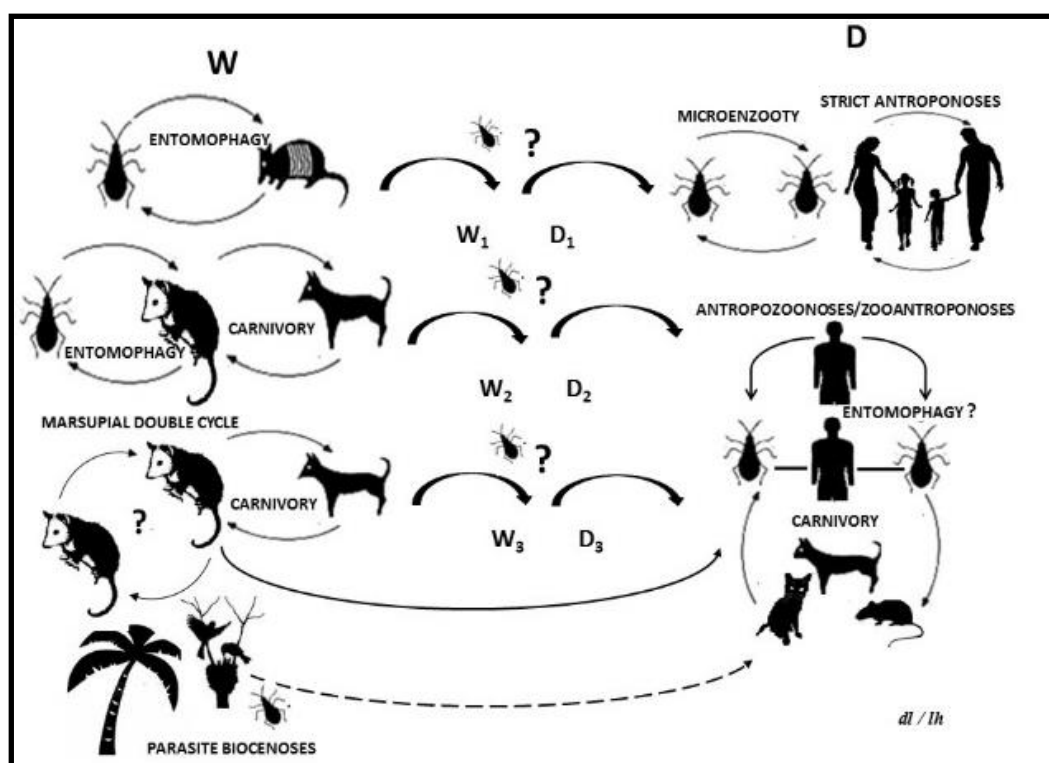


Figura 2. Modalidades y relaciones entre los ciclos de transmisión de *Trypanosoma cruzi*. Ciclo silvestre (W): circulación enzoótica del parásito entre los mamíferos silvestres y sinantrópicos, y otros componentes bióticos. Ciclo Doméstico (D): parásitos circulando como una zooantroposis, antropozoonosis, antroponosis estricta o micro-enzootia. Sub-ciclos silvestres (Wn) y sub-ciclos domésticos (Dn). Los signos de interrogación indican incertidumbre en cuanto a los patrones o procesos de circulación de los parásitos. Las líneas punteadas indican una ruta hipotética (Tomado y traducido de Herrera, 2014).

El estudio del comportamiento de los aislados de *T. cruzi*, obtenidos de diferentes triatomíneos y mamíferos de varias regiones geográficas en modelos de laboratorio, ha permitido conocer la historia natural del parásito y ha revelado su variabilidad biológica, manifiesta en cambios en los valores de la parasitemia, mortalidad, parasitismo tisular y susceptibilidad a drogas, tanto en humanos como en otros modelos animales. La variabilidad determinada entre otros aspectos por la interacción hospedador-parásito y origen de los aislados ha llevado a una primera clasificación de las subpoblaciones del parásito en Biodemos (Buscaglia y Di Noia, 2003; Andrade y col., 2011).

La literatura refiere tres Biodemos: Biodemo I, con curso rápido de la infección, alta virulencia, macrofagotropismo y mortalidad, con predominio de las formas pleomórficas delgadas; Biodemo II, con curso de rápido a medio de la infección, virulencia variable, miotropismo y predominio de formas pleomórficas anchas y delgadas; Biodemo III, con curso de la infección tardío, miotropismo, virulencia y mortalidad baja, y predominio de tripomastigotes anchos (Andrade y Magalhães, 1997).

A su vez *T. cruzi* presenta una variabilidad genotípica producto esencialmente de su propagación clonal, que ha llevado a proponerlo como un conjunto de subpoblaciones del parásito (Andrade y Magalhães, 1997; Herrera, 2010; Zingales, 2011). Mediante electroforesis de enzimas con propiedades catalíticas similares y distinta estructura molecular (Isoenzimas), se ha detectado variabilidad en los perfiles isoenzimáticos de aislados de *T. cruzi* de diferentes regiones geográficas, a estas subpoblaciones variables resultantes de estos análisis se les ha denominado Zimodemos y a la técnica *Multilocus Enzyme Electrophoresis* (MLEE; Miles y col., 1981).

Así, en relación con las zonas endémicas y los hospedadores (triatomino y/o mamífero, incluyendo el humano), se ha venido haciendo referencia a: Zimodemo 1 (Z1), obtenidos de triatomíneos y mamíferos silvestres, con presencia ocasional en el humano y relacionado principalmente al ciclo de transmisión silvestre; Zimodemo 2 (Z2), generalmente aislados de pacientes con ECh, y de mamíferos y triatomíneos del peridomicilio y domicilio, relacionados clásicamente con el ciclo de transmisión doméstico; y Zimodemo 3 (Z3), generalmente atribuido a aislados de armadillos y ocasionalmente de humanos con ECh,

relacionados clásicamente con el ciclo silvestre (Miles y col., 1981; Andrade y Magalhães, 1997, Morocoima y col., 2012).

El análisis de MLEE sumado al análisis del polimorfismo de ADN amplificado aleatoriamente (RAPD “*Random Amplification of Polymorphic DNA*”), han permitido corroborar la naturaleza clonal de *T. cruzi* y establecer las relaciones evolutivas de aislados del parásito, provenientes de diferentes fuentes y áreas geográficas. Algunos autores plantean una posible selección de las subpoblaciones del parásito por sus hospedadores, lo cual se refleja en el comportamiento de la parasitosis, esto junto a la reconstrucción de los Zimodemos, llevó a una clasificación de *T. cruzi* en linajes: Linaje 1 (equivalente a Z2) asociado al ciclo doméstico y Linaje 2 (equivalente a Z1) relacionado con el ciclo de transmisión silvestre, cada uno con una considerable variabilidad genética (Tibayrenc, 1995; Barnabé y col., 2000).

Estudios basados en la amplificación por PCR (*Polymerase Chain Reaction*) de secuencias repetitivas y específicas de ADN, que codifican el espaciador no transcrito del gen de mini-exón y los genes codificantes de la fracción grande (24S α) y pequeña (18S) del ADN ribosomal, han permitido establecer que las poblaciones de *T. cruzi* podían ser clasificadas en dos grandes grupos, denominados *T. cruzi* I (equivalente a Z1, linaje 2) y *T. cruzi* II (equivalente a Z2, linaje 1) tradicionalmente asociados al ciclo de transmisión silvestre y doméstico respectivamente (Souto y col., 1996; Zingales y col., 1999; Anonymous, 1999; Brisse y col., 2001).

Así mismo, con la amplificación del gen del mini-exón y los genes codificantes del ADN ribosomal (24S α y 18S), fue posible establecer que el grupo TcI, está conformado por cuatro genotipos TcIa, TcIb, TcIc y TcId, asociados directamente con el ciclo de transmisión, más no necesariamente, con la distribución geográfica de los hospedadores. En más detalle, el genotipo TcIa fue relacionado con el ciclo de transmisión doméstico, TcIb fue asociado con los ciclos de transmisión doméstico y peridoméstico, mientras que el genotipo TcIc se relacionó con el ciclo de transmisión peridoméstico y finalmente TcId fue asociado con el ciclo de transmisión silvestre (Herrera y col., 2007; Falla y col., 2009).

Respecto a los genotipos que conforman el grupo TcII, mediante la aplicación de MLEE, RAPD y amplificación de los genes codificantes del ADN ribosomal (24S α y 18S), se estableció que este grupo estaba conformado por cinco subgrupos: TcIIa (equivalente a Z3), TcIIb (equivalente a Z2), TcIIc (equivalente a Z3/Z1), TcIIId y TcIIe (híbridos de TcIIb y TcIIc), los cuales presentan variabilidad tanto a nivel clínico-epidemiológico como en su distribución geográfica (Brisse y col., 2001, de Freitas y col., 2006).

Respecto a la clasificación de *T. cruzi*, se ha planteado la existencia de las Unidades de tipificación discreta (DTUs “Discrete Typing Unit”), las cuales hacen referencia al conjunto de clones del parásito que presentan algunos intercambios genéticos y eventos de recombinación e hibridación, que pueden generar diversidad genética dentro del taxón y servir como potenciales marcadores evolutivos, ya que revelan la acción de la evolución clonal sobre *T. cruzi*, y la relación con su comportamiento biológico, mediante el análisis de MLEE, y RAPD con generación de dendrogramas. Así las subpoblaciones de *T. cruzi* se clasificaron más recientemente en seis DTUs ó *clusters*: DTU1 (TcI), DTU2a (TcIIa), DTU2b (TcIIb), DTU2c (TcIIc), DTU2d (TcIIId) y DTU2e (TcIIe) (Tibayrenc, 2003; Zingales y col., 2009 y 2012).

En el 2009, se realizó un consenso con respecto a la nomenclatura de las subpoblaciones de *T. cruzi*, planteando una nueva clasificación, basada en las DTUs (Zingales y col., 2009) quedando agrupados de la siguiente manera:

- *T. cruzi* I (TcI, Z1 ó DTU1): grupo más antiguo y homogéneo, asociado principalmente aecótopos silvestres/sinantrópicos, didelfidos, roedores y triatomíneos, distribuido principalmente al norte de la cuenca amazónica, aunque con presencia en algunos países del sur,
- *T. cruzi* II (TcIIb, Z2 ó DTU2b): subpoblación heterogénea, asociada al ciclo doméstico y silvestre, en particular a desdentados, roedores, carnívoros y primates; la distribución esta dada con preponderancia en el Cono Sur,
- *T. cruzi* III (TcIIc, Z3/Z1 ó DTU2c): asociada principalmente con la transmisión enzoótica entre mamíferos terrestres y cavadores, presente en algunos casos de infección humana; mayormente restringida al sur de la cuenca amazónica y ocasionalmente presente en el oriente de Venezuela y noroccidente de Brasil,

- *T. cruzi* IV (TcIIa, Z3 ó DTU2a): asociado a enzootias, con casos particulares en canidos y primates silvestres y presente ocasionalmente en infecciones humanas. Reportada principalmente al sur de la cuenca amazónica, y ocasionalmente en Colombia, Venezuela y Canadá,
- *T. cruzi* V (TcIIId, Cepa Boliviana Z2, rDNA ½ ó DTU2d): asociado a ciclos de transmisión domésticos, hospedadores humanos y triatominos, tradicionalmente restringido al Cono Sur,
- *T. cruzi* VI (TcIIId, Cepa Paraguaya Z2 ó DTU2e): asociado a los ciclos de transmisión doméstico, preponderantemente a humanos y triatominos domiciliados del Cono Sur.

Los seis DTUs se encuentran relacionados a especies de triatominos y mamíferos de diferentes áreas geográficas, en los cuales se observa variabilidad en el comportamiento biológico e histopatológico de la parasitosis (Telleria y Tibayrenc, 2010; Ferreira y col., 2012; Carrasco y col., 2012; Morocoima y col., 2012; Cruz-Guzmán y col., 2014; Figura 3).



Figura 3. Distribución geográfica de los genotipos de *Trypanosoma cruzi* en las Américas. (1) TcI; (2) TcII; (3) TcIII; (4) TcIV; (5) TcV; (6) TcVI; la línea punteada indica la división de la cuenca amazónica. Modificado de Patterson y Guhl, 2010.

Algunos autores han planteado que la evolución de los dos grandes grupos de *T. cruzi* (TcI y TcII) ocurrió aproximadamente 150 millones de años atrás, encontrándose asociado con el periodo de aislamiento geográfico entre Laurasia (hoy en día Norte América) y Gondwanaland (hoy en día Sur América), lo que esta correlacionado con la separación y dispersión de los mamíferos primitivos, además ha sido evidenciado que algunos ancestros de la fauna americana como los marsupiales, edentados y ungulados (originarios de Sur América) y placentados carnívoros, placentados insectívoros y roedores (originarios de Norte América y África), fueron reservorios de los tripanosomas ancestrales TcI y TcII respectivamente (Briones y col., 1999; Zingales, 2011).

Otras hipótesis sobre la divergencia de los grupos de *T. cruzi*, plantea que roedores caviomorfos y primates (reservorios de TcII), se desplazaron de África hacia Norte América y posteriormente ingresaron a Sur América (37 Ma), mucho antes de la formación del istmo de Panamá, a través de una especie de saltos en islas y a su vez los marsupiales (reservorios de TcI) de Sur América, se desplazaron a lo largo de Norte América. Posteriormente, el intercambio de mamíferos y genotipos del parásito, se masificó entre las Américas con la formación del istmo de Panamá (2 a 5Ma); así pues TcI puede estar principalmente relacionado con el ciclo de transmisión silvestre, por su asociación originaria con los marsupiales, mientras que TcII se relaciona principalmente con el ciclo de transmisión doméstico, por estar asociado con primates y mamíferos placentados. Sin embargo la asociación entre genotipos y mastofauna americana sigue siendo un punto de debate que requiere mayor estudio (Zingales, 2011).

Los genotipos de *T. cruzi* no son exclusivos de un área geográfica restringidos a determinados hospedadores/vectores ó asociados a un cuadro clínico histopatológico determinado, ya que en mamíferos y vectores simpátricos pueden circular más de un genotipo, siendo que en un mismo ecótopo puedan encontrarse varios ciclos de transmisión independientes (Herrera, 2010).

La utilización de enzimas de restricción para la identificación de polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción (RFLPs “*Restriction Fragment Length Polymorphism*”), en los genes que codifican secuencias muy conservadas entre las especies, tales como las proteínas de choque térmico HSP60, proteínas de membrana GPI y

proteínas de soporte como las Histonas H1, entre otros, ha permitido corroborar la heterogeneidad genética intraespecífica en aislados de *T. cruzi*, debido a las variaciones en los patrones de restricción, que confirman la presencia de las seis DTU del parásito en Latinoamérica (Westenberger y col, 2005; Lewis y col., 2009).

Algunos autores han caracterizado aislados de *T. cruzi*, obtenidos de varios hospedadores de diferentes zonas geográficas, a nivel biológico y molecular, evaluando los parámetros parasitológicos, tropismo tisular y determinando los genotipos circulantes mediante herramientas moleculares (PCR-24S α rDNA, PCR-RFLPs entre otras), confirmando en algunos casos heterogeneidad biológica aun para el mismo genotipo (*T. cruzi* IV por ejemplo) para aislados de diferentes hospedadores (Rimoldi y col., 2012).

En estudios de aislados de *T. cruzi* provenientes de varios hospedadores y diferentes áreas geográficas de Venezuela empleando PCR-RFLPs, se ha registrado variabilidad genotípica evidenciada por la presencia de tres DTU (TcI, TcIII y TcIV) en diferentes áreas geográficas particularmente con mayor variabilidad genotípica en los aislados obtenidos de triatominos en relación a los de mamíferos (Carrasco y col., 2012; Morocoima y col., 2012; Cruz-Guzmán y col., 2014).

2.5.Parasitismo tisular de *Trypanosoma cruzi*

Algunos autores han considerado que *T. cruzi* es un parásito que presenta un amplio parasitismo tisular en el mamífero; esto quizás se deba a que el parásito puede circular entre varios triatominos y mamíferos, ocurriendo un intercambio activo de clones del parásito que puede favorecer la selección multiclonal. Un aislado de *T. cruzi* puede estar constituido por más de un clon, seleccionado a favor o en contra en función de factores como estrés, choques térmicos en el paso del mamífero al vector, sistema inmunológico del hospedador, entre otros, variando en su comportamiento biológico, clínico-epidemiológico y conformación genética, como se discute en las teorías que soportan el modelo histotrópico clonal (Lenzi y col., 1996; Macedo y col., 2002; Pizzi y col, 2005; Ferreira y col., 2012; Figura 4).

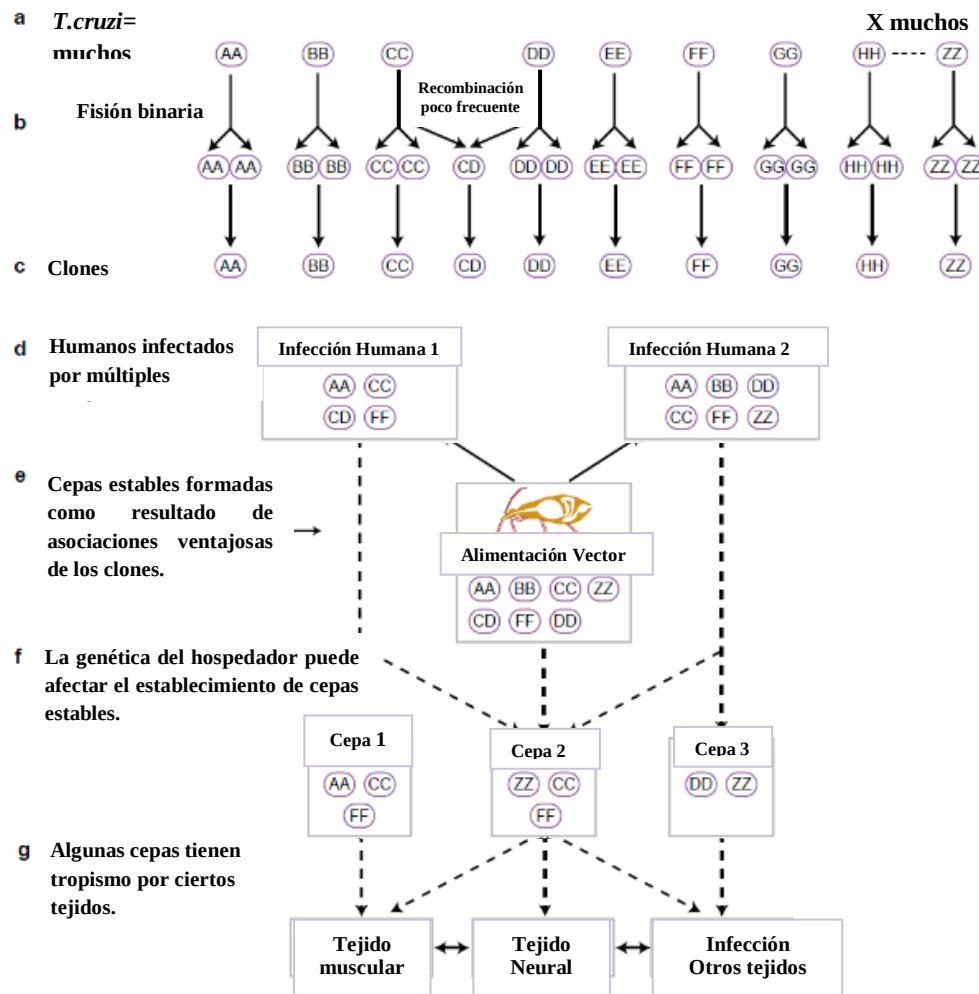


Figura 4. Modelo de histotropismo clonal de la Enfermedad de Chagas. La combinación de letras en las modalidades de infección y cepas, indica los posibles clones. (Modificado de Macedo y col, 2002).

El modelo histotrópico clonal de *T. cruzi* ha sido evaluado por varios autores, los cuales han confirmado la variabilidad en el parasitismo tisular independientemente del origen y genotipo del aislado, siendo los tejidos musculares cardíaco y esquelético, los que mayormente se ven afectados. Sin embargo, también se han evidenciado nidos de amastigotes con menor grado de invasión en hígado, riñón, bazo, tejido graso, córnea y médula ósea (Magalhães-Santos y col., 2004; Herrera y col., 2005; Ferreira y col., 2012).

Herrera y col., (2005), demostraron que durante la colonización inicial del parásito en el modelo murino y en lo que sería la fase aguda de la infección, el tejido graso es

preferentemente invadido por *T.cruzi*, independientemente del origen y genotipo del aislado, debido a que este tejido proporciona un hábitat energéticamente activo, ofreciendo recursos esenciales para su proliferación. Esto explicaría la presencia de tripomastigotes metacíclicos en áreas ricas en lípidos, como las glándulas anales de los didelfídeos.

Algunos autores han planteado que hay parasitismo tisular selectivo en función de los genotipos del parásito. Así, los genotipos TcI y TcIV estarían más relacionados con la invasión de corazón y músculo esquelético; en tanto el genotipo TcIV al igual que los genotipos TcII, TcIII, TcV y TcVI, invadirían el tejido digestivo y el timo, presentándose en los dos primeros casos los síndromes de megaesófago y megacolon; TcI ha sido considerado por algunos autores como el genotipo menos patógeno y con bajas parasitemias comparado con los demás genotipos.

La asociación entre genotipo y el parasitismo tisular es multifactorial; características como heterogeneidad del parásito, sistema inmunológico del hospedador, origen de los aislados, carga parasitaria y aspectos ecopatogenicos pudiesen ser determinantes de la historia natural de la parasitosis (Macedo y col., 2002; Calderón-Arguedas y col, 2002; Di Noia y col, 2002; Telleria y Tibayrenc, 2010; Zingales y col., 2012).

2.6. Tripanosomiasis Americana o Enfermedad de Chagas.

En 1909 en Minas Gerais-Brasil, el doctor Carlos Chagas un insigne investigador brasileño, fue quien describió por primera vez a la enfermedad de Chagas (ECh) o Tripanosomiasis Americana (TA), al descubrir un flagelado simultáneamente en el intestino de insectos hematófagos, en sangre de varios animales domésticos, en sangre de un humano (la niña Berenice) y en la de un primate. La especie fue nominada *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi*, en honor a su tutor, el Dr. Oswaldo Cruz (Araujo-Jorge y col., 2010).

Esta parasitosis, es incluida por la Organización Mundial de la Salud (OMS) dentro de las “enfermedades desatendidas u olvidadas” (*neglected diseases*), es autóctona del Neotrópico y se extiende desde el Centro-Sur de los Estados Unidos hasta el sur de Argentina y Chile, coincidiendo con la distribución geográfica de los hospedadores (triatominos y mamíferos). En las últimas décadas han sido reportados casos en Canadá,

Europa y Australia, debido a los procesos de migración tanto de mamíferos como triatominos y/o las transfusiones sanguíneas no controladas, la venta de órganos y fluidos, lo que extiende la posibilidad de dispersión de la parasitosis (Brener y col., 2000; Schmunis, 2007; WHO, 2016; Figura 5).



Figura 5. Distribución geográfica de la Tripanosomiasis Americana en el mundo.

Modificado de: <http://www.dndi.org/diseases-projects/chagas> (2016)

Aufderheide y col., (2004), plantearon la posibilidad de que la TA tenga un origen remoto en la época precolombina, debido a los hallazgos del genoma de *T.cruzi* en momias del Pacífico Americano (7.500 A.C. hasta 1.500 A.C).

La TA esta influenciada por factores epidemiológicos, bioecológicos y socioeconómicos; recientemente se han presentado brotes de la parasitosis en la población humana a nivel urbano y rural en Venezuela, posiblemente por efectos antrópicos que acercan a los vectores a la vivienda (Briceño-León, 2009; Alarcon de Noya y col., 2009; Añez y col., 2013).

Más de cien años después del descubrimiento de la TA, ésta sigue siendo considerada como la enfermedad parasitaria más importante de América en términos económicos y sociales, debido a su estrecha relación con el subdesarrollo social y económico, puesto que

genera un impacto en la productividad de los trabajadores al desencadenar discapacidad prematura y muerte, provocando una pérdida de 670.000 años de capacidad de vida útil/año en la población humana (Schofield y Dias, 1998; Tarleton y col., 2007; Guhl y Lazdins-Helds, 2007).

2.7.Situación de la Tripanosomiasis Americana en Venezuela.

La historia natural de esta parasitosis en Venezuela data de 1919, cuando Enrique Tejera describió para Venezuela los primeros casos de la TA en los estados Zulia y Trujillo. En 1933, José Torrealba describió la presencia y severidad de esta dolencia en los llanos del Guárico, con viviendas rurales de alto riesgo y domiciliación elevada de *R.prolixus* (Añez y col., 2003).

Benaïm-Pinto (1949), reportó un índice de infección de 30% en *R. prolixus* y de 100% en *P. geniculatus*, provenientes del interior de viviendas de la región de Petare, área rural que sería luego parte de la Gran Caracas. En esos estudios también se reportó un 20% de infección en humanos mediante pruebas de xenodiagnóstico.

Entre los años 1960 y 1973 se reportaron alrededor de 5.000 muertes por el padecimiento de la ECh en el país, a pesar de los programas de mejoramiento de la vivienda rural y de control de la ECh, los cuales tenían como objetivo la interrupción de la transmisión intradomiciliaria a través de la utilización de químicos (insecticidas) para el control de vectores intradomésticos. Entre 1962 y 1971 los valores de seroprevalencia correspondieron 51,3% de la población nacional; sin embargo en la década de los años 80 la seropositividad de la parasitosis fue reducida significativamente como resultado de la campaña anti-chagásica (Añez y col., 2003).

Seis años más tarde, Pífano (1986) reportó un *dossier* de 15 años de estudio en zonas altamente urbanizadas del valle de Caracas, registrando a *P.geniculatus* con un 39% de infección para *T.cruzi* y 0,5% para *T.rangeli*; un índice de infección del 47% en *D.marsupialis* y dos casos de infección natural en *Calluromys phillander* y *Sciurus granatensis* (ardilla). El autor reportó un único caso positivo en un humano del sector

Prados del Este (Caracas), por inoculación accidental cuando la persona trituro al vector sobre la zona de picadura.

Sampson-Ward y Urdaneta-Morales (1988), Herrera y Urdaneta-Morales (1997), corroboraron la existencia de estos focos enzoóticos de *T. cruzi* en la urbe Caraqueña, en los cuales participaba *P. geniculatus*, *D. marsupialis*, y *R. rattus*.

Los programas de control y prevención de la transmisión de la parasitosis, contribuyeron en la disminución del índice de infestación por *R. prolixus* en las viviendas, pasando de un 80% (1958-1968) a un 4% (1990-1998); a su vez la seroprevalencia en humanos disminuyó de un 45% a 8% respectivamente. A pesar de dicha disminución, en 1999 ocurrió la aparición de nuevos casos agudos de la parasitosis en el occidente del país (Estado Barinas), con una tasa de mortalidad del 12,5% (Añez y col., 1999; Añez y col., 2003).

Aché y Matos (2001), basados en la información recopilada durante 1958-1998 por el sector oficial, reportaron una reducción del área endémica de 750.000 Km² a 365.000 Km², estimándose que alrededor de 4 millones de habitantes vivían bajo condiciones de riesgo. Dentro de los estados con incidencia de la parasitosis en Venezuela son señalados Barinas, Portuguesa, Lara, Trujillo, Cojedes, Yaracuy, Falcón, Carabobo, Guárico, Miranda, Distrito Capital, Anzoátegui, Monagas y Amazonas (Añez y col., 2003; Moncayo, 2003; Añez y col., 2004; Alarcón de Noya y col., 2009; Noya-Alarcón y col., 2011; Figura 6).

Añez y col., (2007), plantearon la reemergencia de la ECh en Venezuela debido a la presencia de 9 casos agudos, algunos de resolución fatal en los estados Barinas y Trujillo. Así mismo, Morocoima y col. (2008) reportaron por primera vez para el estado Anzoátegui un caso agudo de ECh correspondiente al genotipo TcI, zona no considerada endémica hasta ese momento.

En el 2007 se presentó el brote agudo por infección oral más numeroso de América Latina, en maestros y niños de una escuela del Municipio Chacao, estado Miranda (Alarcón de Noya, 2008; Alarcón de Noya y col., 2009), produciéndose lo que se anunciaba como

riesgo de una transmisión activa de *T. cruzi* al ser humano en la gran Caracas (Pífano, 1986; Herrera y Urdaneta-Morales, 1997).

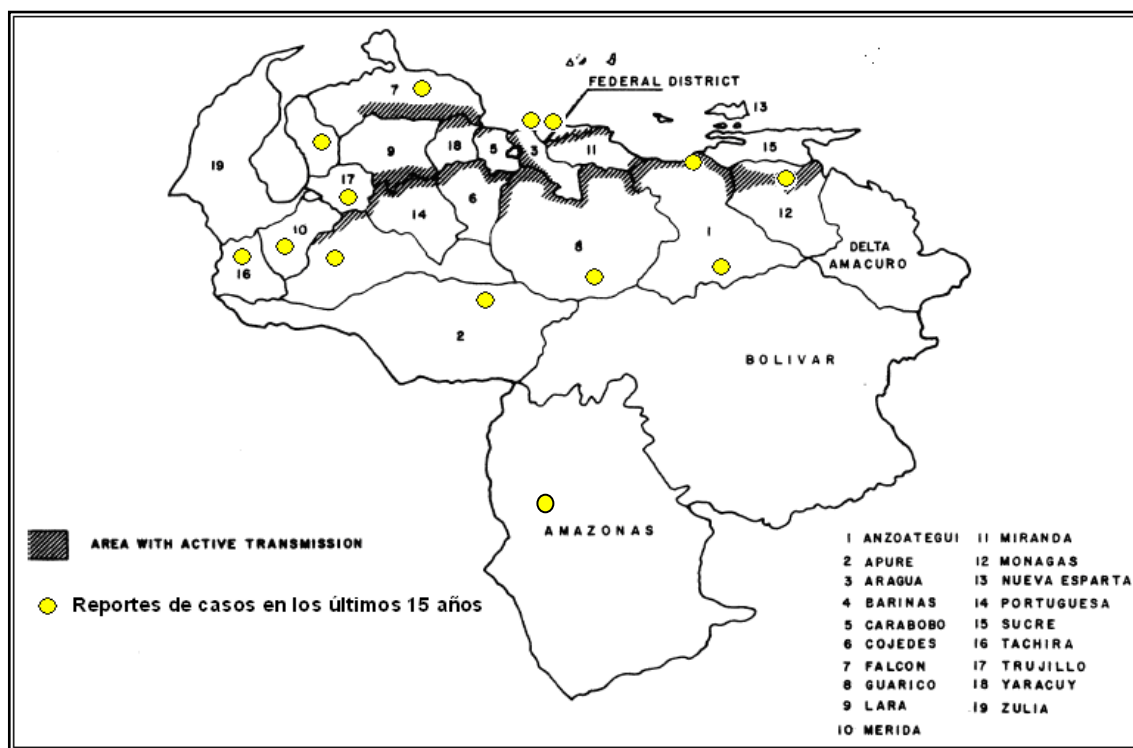


Figura 6. Distribución geográfica de la Tripanosomiasis Americana en Venezuela. Tomado y actualizado de Aché y Matos 2001; Noya-Alarcón y col., 2011.

Rojas y col., (2008) reportaron prevalencias para la ECh entre el 11% y 16% en los estados centro-occidentales y nor-orientales de Venezuela, al analizar pacientes referidos a centros de salud con diagnóstico presuntivo de ECh, y frecuencias de casos agudos entre 45% y 65% para los seropositivos.

Otros casos de infección de *T. cruzi* por transmisión oral fueron reportados en el sector de San José de Cotiza del municipio Libertador (Distrito Capital) en el año 2008, en Chichiriviche de la Costa, Estado Vargas (2009); en el sector de Antímano (Distrito Capital) en 2010 y nuevos casos de infección en el mercado Municipal de Coche, Municipio Libertador (Distrito Capital) en 2012, lo que mantiene la situación de alarma sobre el manejo sanitario de alimentos y de las condiciones ambientales de población vulnerable (Alarcón de Noya y col., 2010 y 2012). Así mismo, Añez y col., (2013) reportaron un pequeño brote oral en una familia del área rural del estado Mérida.

Factores como la migración humana incontrolada procedente de áreas endémicas, llevando hospedadores mamíferos domésticos y vectores infectados con *T. cruzi*, la urbanización desorganizada, la deforestación y la presencia de mamíferos silvestres y sinantrópicos infectados (marsupiales, murciélagos, roedores, desdentados, carnívoros y primates), son elementos que se deben tener en cuenta para establecer con mayor precisión el riesgo de que la infección con *T. cruzi* se derive de una enzootia a una zooantroponosis (Guimarães-Drumond y Marcopio, 2006).

3. HIPÓTESIS DE TRABAJO

Con base a los antecedentes, se propuso estudiar aislados de *Trypanosoma cruzi* obtenidos de triatomíneos y mamíferos de diferentes localidades de las regiones Oriental y Centro-Occidental de Venezuela, evaluando su variabilidad genotípica y el comportamiento biológico del parásito, para establecer si dicha variabilidad está asociada con el complejo ecopatogénico (área geográfica, ecótopo, origen del parásito, biología de la parasitosis) o bien se deba exclusivamente a la naturaleza propia del parásito.

4. JUSTIFICACIÓN

La Tripanosomiasis Americana ha sido generalmente circunscrita al hábitat rural, siendo el proceso de domiciliación de los triatomíneos y el comportamiento sinantrópico de los mamíferos, los que condicionan el paso de la enzootia a la zoonosis. Son pocas las investigaciones en Venezuela que combinan el estudio de las características biológicas y genotípicas del parásito, relacionándola con el origen de los aislados (sea de mamíferos o triatomíneos), la distribución geográfica y los ecótopos de los componentes del ciclo de transmisión, lo cual marcaría al contexto ecológico de la TA. Es por ello que este tipo de estudios, permitiría tener una visión más amplia y completa sobre los complejos ecopatogénicos de la parasitosis y sus particularidades dentro de cada ecótopo. Adicionalmente, conocer el comportamiento del parásito en sus hospedadores, permitiría proponer estrategias de control y vigilancia de la parasitosis.

5. OBJETIVOS

5.1. Objetivo General

Evaluar las características biológicas y genotípicas de aislados de *Trypanosoma cruzi* provenientes de mamíferos y/o triatomíneos de diferentes complejos ecopatogénicos de la Tripanosomiasis Americana en Venezuela.

5.2. Objetivos específicos

- Establecer la presencia de *T. cruzi* en triatomíneos y mamíferos de diferentes áreas de Venezuela.
- Caracterizar biológica y genotípicamente los aislados de *T. cruzi* obtenidos en las áreas de estudio.
- Establecer la asociación entre las características biológicas y genotípicas del parásito en relación con hospedador de origen, área geográfica y condiciones de transmisión de la Tripanosomiasis Americana en cada área estudiada.

6. MARCO METODOLÓGICO

6.1. Área de estudio

El estudio fue realizado en seis estados de Venezuela (Anzoátegui, Sucre, Cojedes, Portuguesa, Miranda y Distrito Capital) agrupados para este estudio en región Oriental y región Centro-occidental (Figura 7), regiones en las cuales previamente había sido reportada la presencia de alguno de los elementos del ciclo de transmisión de *T. cruzi*, tales como incidencia del parásito, presencia de mamíferos infectados incluyendo al hombre y/o presencia de triatominos (Morocoima y col., 2008, 2010 a-b; Alarcón de Noya y col., 2009; Carrasco y col., 2012).

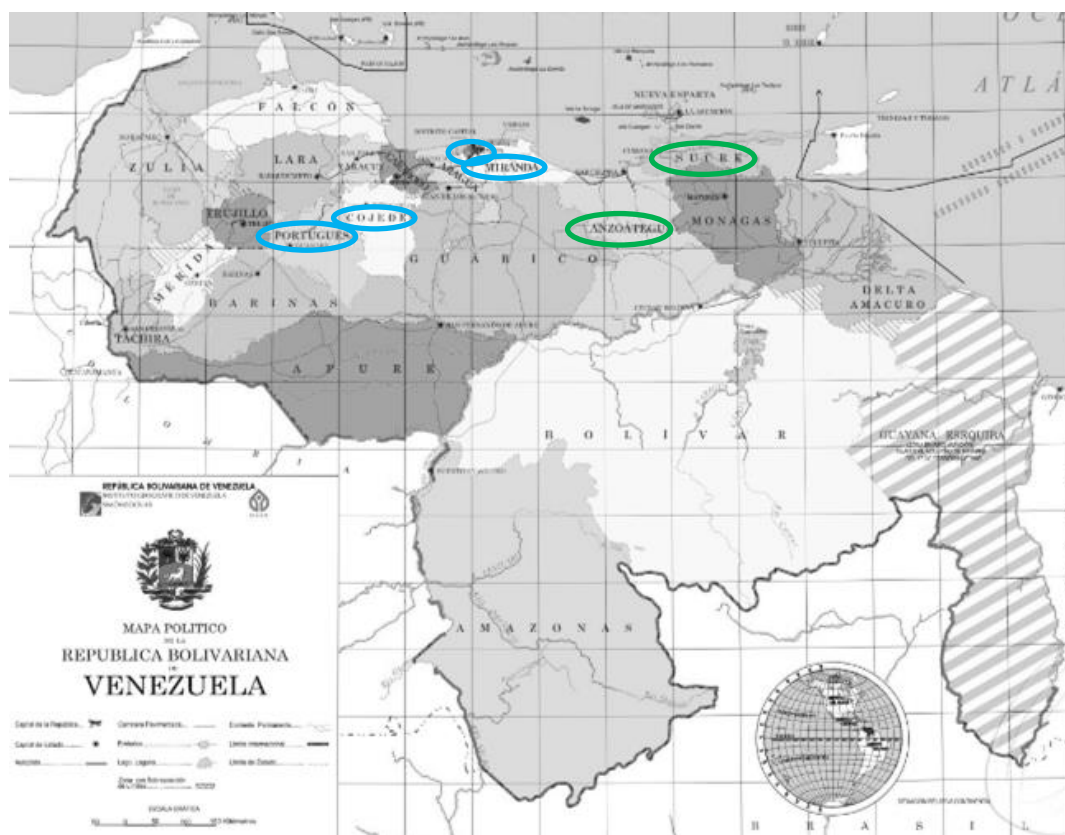


Figura 7. Área de estudio. Regiones geográficas. Óvalos verdes: región oriental (estados Anzoátegui y Sucre); Óvalos azules: región Centro-Occidental (Distrito Capital, Estados Miranda, Cojedes y Portuguesa). Mapa tomado y modificado de <http://gobiernoonlinea.gob.ve/home/venezuela.dot> (22-6-2016).

La región Oriental estuvo comprendida por el estado Anzoátegui con las localidades: El Enial, Angostura, Naricual, La Ceiba, San José de las Margaritas del Llano, Puerto la Cruz,

Altos de Guanta, Cambural, Bergantín, Los Olivos y Los Ranchos; regiones ubicadas entre la región de los llanos orientales, y el sistema litoral montañoso del Estado, con clima semiárido, temperatura promedio de $34^{\circ}\text{C}+3^{\circ}\text{C}$ y precipitaciones entre 787 y 900 mm, constituyendo un bloque de vegetación entre sabanas abiertas y matorrales boscosos tropicales con áreas de interrupción de sabana secundaria. En el Estado Sucre (Altos de Sucre, El Maco, Yaguaracual, La Sabana, San Pedro) con clima tropical, temperatura media anual es de $27^{\circ}\text{C}+2^{\circ}\text{C}$, precipitación de 360 mm, con variaciones importantes determinadas por perturbaciones atmosféricas propias de la litoralidad, vegetación de corteza gruesa y espirales de zona costera, cobertura boscosa hacia las serranías de Paria y Turimiquire, y las zonas de manglares en áreas de desembocadura de ríos a lo largo del litoral (Instituto Nacional de Estadística, 2013).

La región Centro-Occidental conformada por el Distrito Capital y los estados Miranda, Cojedes y Portuguesa. Para el Distrito Capital se incluyeron las localidades: Caricuao, Cotiza, El Marques, La Pastora, Avenida Panteón, La Vega y Valle Coche, caracterizadas por presentar clima estacional, temperatura promedio de $25^{\circ}\text{C}+3^{\circ}\text{C}$, precipitación de 1011 mm, con relictos de bosque húmedo premontano, vegetación distribuida en parches con especies autóctonas de arbustos y árboles de gran porte y parches de sabana secundaria y relictos boscosos (Instituto Nacional de Estadística, 2013).

El estado Miranda incluyendo las localidades: Colinas de Bello Monte, Chacao, Macaracuay, El Cafetal, Alto Prado, Los Palos Grandes, Terrazas del Club Hípico, Parque Caiza, Petare, Araira, El Hatillo, Baruta, Hoyo de la Puerta, La Mariposa, Santa Teresa del Tuy, San Francisco de Yare, Ocumare del Tuy, San Antonio de los Altos, y Cúpira, caracterizado por un clima cálido en las zonas bajas, temperatura entre 20°C y 42°C , con fluctuaciones entre 10°C y 23°C , relieve accidentado y abrupto, con altas pendientes y estrechos valles intramontañosos (Instituto Nacional de Estadística, 2013).

En el estado Cojedes fueron muestreados mamíferos y triatomíneos, bajo la coordinación del Dr. Cruz Manuel Aguilar en localidades como La Escopeta, Las Rosas y Nuevo Mundo. Localidades que se caracterizan por presentar un clima de sabana, con temperatura media anual de $26^{\circ}\text{C}+1^{\circ}\text{C}$ y precipitación entre 1300-1600 mm, incrementándose entre 1900-2000 mm hacia las áreas montañosas con variantes entre bosque húmedo premontano, húmedo

tropical y muy húmedo tropical, la mayor parte del Estado se encuentra bajo la influencia de la zona de vida de bosque seco tropical, a excepción de la parte noroccidental (cuencas altas de los ríos San Carlos y Tucuragua).

En el Estado Portuguesa fueron visitadas las localidades Jabillal, Las Panelas y Ararure, zonas de transición entre las últimas estribaciones de la cordillera de los andes venezolanos y las llanuras, caracterizadas por tierras planas, paisajes de montaña y piedemonte, con temperatura entre 22°C y 26°C y precipitaciones persistentes (Instituto Nacional de Estadística, 2013). Algunas muestras de triatominos fueron suministradas por el Técnico entomólogo Jose Alberto Lara de la división regional del Ministerio del poder popular de salud (MPPS).

En cada área de estudio los muestreos de mamíferos y triatominos fueron realizados en ecótopos domésticos (D), peridomésticos (PD) y silvestres(S) accediendo por vía terrestre, con un total de 2 a 3 entradas puntuales por localidad por año desde 2009 a 2014, sin seguimiento longitudinal. Los lugares de muestreo fueron georeferenciados a través de un equipo de posicionamiento global Garmim III GPS (Garmin International, Olathe, KS) mediante los programas *MapSourceSoftware* y *ArcGis 9.3* (Environmental Systems Research Institute, Redlands, CA, USA; Tabla 1).

Tabla 1. Regiones geográficas, localidades y coordenadas de las áreas de estudio.

Región geográfica	Estado	Localidad	Coordenadas	
			N	W
Oriental	Anzoátegui	Altos de Guanta	10° 13' 30.4"	64° 32' 8.8"
		Angostura	10° 4' 60"	64° 34' 60"
		Bergantín	10° 1' 7.6"	64° 21' 45.8"
		Cambural	9° 51' 00.7"	64° 50' 0.1"
		El Enial	10° 7' 32.6"	64° 37' 6.5"
		La Ceiba	8° 50' 60"	63° 46' 60"
		Los Olivos	9° 47' 44.2"	63° 13' 55.3"
		Los Ranchos	10° 11' 08.0"	64° 37' 05.2"
		Naricual	10° 4' 41.5"	64° 37' 11.8"
		Puerto la Cruz	10° 10' 29.5"	64° 39' 02.0"
		San Jose de las Margaritas del Llano	9° 28' 52.9"	64° 37' 23.7"
	Sucre	Altos de Sucre	10° 13' 4.67"	64° 32' 59.4"
		El Maco	10° 11' 60"	63° 49' 60"
		La Sabana	10° 13' 4.9"	64° 25' 15.9"
		San Pedro	10° 13' 6.9"	64° 25' 17.9"
		Yagaracual	10° 18' 27.0"	64° 20' 29.8"
Centro-Occidental	Distrito Capital	Avenida Panteón	10° 30' 39.2"	66° 90' 39.5"
		Caricuao	10° 25' 48.5"	66° 58' 35.3"
		Cotiza	10° 31' 3.2"	66° 54' 31.3"
		El Marques	10° 29' 47.1"	66° 48' 45.6"
		La Pastora	10° 30' 44.9"	66° 55' 11.5"
		La Vega	10° 27' 37.3"	66° 56' 31.9"
		Valle Coche	10° 28' 37.8"	66° 53' 45.3"
	Miranda	Araira	10° 27' 27.0"	66° 29' 44.2"
		Alto Prado	10° 26' 22.4"	66° 53' 35.0"
		Baruta	10° 22' 43.5"	66° 51' 7.8"
		Chacao	10° 29' 37.9"	66° 51' 23.7"
		Colinas Bello Monte	10° 28' 53.8"	66° 52' 36.0"
		Cupira	10° 9' 38.4"	65° 41' 54.7"
		El Cafetal	10° 28' 10.7"	66° 49' 43.1"
		El Hatillo	10° 25' 25.3"	66° 49' 31.1"
		Hoyo de la Puerta	10° 22' 29.0"	66° 53' 8.2"
		La Mariposa	10° 23' 6.7"	66° 55' 30.2"
		Macaracuay	10° 27' 45.9"	66° 49' 7.0"
		Terrazas Club Hípico	10° 26' 53.2"	66° 52' 26.9"
		Ocumare del Tuy	10° 8' 19.55"	66° 52' 26.9"
		Parque Caiza	10° 28' 12.5"	66° 45' 0.26"
		Petare	10° 28' 13.6"	66° 47' 57.3"
		San Antonio de los Altos.	10° 22' 10.7"	66° 57' 25.6"
		San Francisco de Yare	10° 10' 45.9"	66° 43' 29.4"
		Santa Teresa del Tuy	10° 16' 15.0"	66° 42' 14.83"
	Cojedes	La Escopeta	9° 65' 9.89"	68° 58' 8.9"
		Las Rosas	9° 76' 31"	68° 62' 62"
		Nuevo Mundo	9° 53' 39.8"	68° 33' 15.8"
	Portuguesa	Jabillal	9° 42' 39"	69° 18' 36"
		Las Panelas	8° 58' 30"	69° 58' 0.8"
		Araure	9° 34' 31.6"	69° 13' 51.0"

6.2. Muestreo de los hospedadores (Triatominos y Mamíferos)

El muestro de hospedadores fue de tipo no probabilístico a fin de obtener el mayor número de muestras posibles disponibles, debido a la variedad en cuanto a la presencia de hospedadores en los ecótopos domésticos, peridomésticos y silvestres, con presencia de mamíferos y ausencia de triatominos o viceversa según la localidad. Se tuvo en cuenta una muestra representativa no menor a 20 hospedadores para cada región geográfica. El cero fue un valor de presencia o ausencia para este muestreo (Castillo, 2009; Morocoima y col, 2010^a; 2010^b).

6.2.1. Muestreo de triatominos

Los triatominos muestreados fueron colectados mediante búsqueda activa y pasiva:

➤ **Búsqueda activa:** basada en visitas diurnas y vespertinas mediante búsqueda manual en las viviendas de los humanos (visita al ambiente doméstico con previo consentimiento informado, Anexo 1), revisando todos los cuartos de la vivienda (cocina, habitaciones, sala, entre otros) y compartimientos como paredes, pisos, techos, colchones, muebles y enseres, al igual que en la vegetación de su entorno, especialmente en palmas y los anexos del peridomicilio tales como: gallineros, establos, nidos de aves, cuevas de animales.

Se realizó la búsqueda activa de diferentes estadios evolutivos de los triatominos, a razón de 1 hora/hombre/vivienda para el domicilio. El protocolo de búsqueda se realizó explorando la vivienda desde el exterior hacia el interior, con el siguiente recorrido: techo afuera (sección del techo de la vivienda que sobresale al exterior), pared afuera (lado externo de las paredes), acera afuera (la acera contigua), techo habitación, pared habitación, piso habitación, techo sala, pared sala, piso sala, techo cocina, pared cocina, piso cocina, techo baño, pared baño y piso baño (Reyes-Lugo, 2009).

La búsqueda también fue realizada en el peridomicilio (PD), área considerada desde los muros exteriores de la vivienda, hasta 30 m alrededor de la misma, en donde se analizó al azar el 30% (dividiendo en 6 cuadrantes de 30m X 10m) buscando triatominos en las paredes exteriores, acumulos de material (tejas, tabique, piedras, madera y otros), gallineros, cercas, cuartos aledaños donde se guarda material de labranza, madera, leña y

hojas de maíz. A su vez se reviso el área silvestre (S) que comprendió el espacio más allá de 30m del PD y hasta los sembradíos cercanos (1000m) que rodeaban las localidades (Bautista y col., 1999).

Muy ocasionalmente en pocos caserios de la región oriental, se realizo la captura de triatominos con trampas con cebo vivo o “Trampas Noireau”, conformadas por frascos plásticos de tamaño mediano, cerrados con una malla plástica y cubiertas con cinta adhesiva doble cara en el borde para permitir la adherencia de triatominos. En el interior se colocaba un ratón blanco (Cepa NMRI, comprobadamente sano) con una porción de papa para su hidratación. Las trampas fueron colocadas en las viviendas al atardecer y retiradas a la mañana siguiente (Noireau y col., 1999). En los ecótopos PD y S se utilizaron trampas tipo “Shannon” de fabricación casera, las cuales consistieron en la colocación de un lienzo blanco (2m²) con una fuente de luz blanca incandescente por detrás del lienzo, a fin de atraer insectos fotofílicos. Las trampas fueron instaladas cerca de las 21:00 horas y monitoreadas de 4 a 5 horas consecutivas y posteriormente retiradas. Los insectos obtenidos se almacenaron en frascos de vidrio para posterior identificación (Shannon, 1939; Figura 8).

Los muestreos de triatominos se realizaron dos veces/año en cada región, a razón de 3 días por visita, con un esfuerzo de captura de 5 horas/hombre por día o noche, cuidando de cubrir periodos de lluvia y sequía, cuando fue posible determinarlo (Pinchin y col., 1981).



Figura 8. Búsqueda activa de triatomíneos. A) Búsqueda manual en el Domicilio; B) Búsqueda manual en el peridomicilio y ecótopo silvestre. C). Captura de triatomíneos mediante Trampa Noierau en el Domicilio; D) Captura de triatomíneos con trampa de luz tipo Shannon en Peridomicilio y ecótopo Silvestre (Fotos: Lozano-Arias, D).

➤ **Búsqueda pasiva:** consistió en entrenar a los habitantes de cada localidad para el reconocimiento de triatomíneos y colecta segura de los ejemplares que visitaban las viviendas atraídos por la luz, en horas y días en los cuales no se realizó la búsqueda directa (Figura 9).

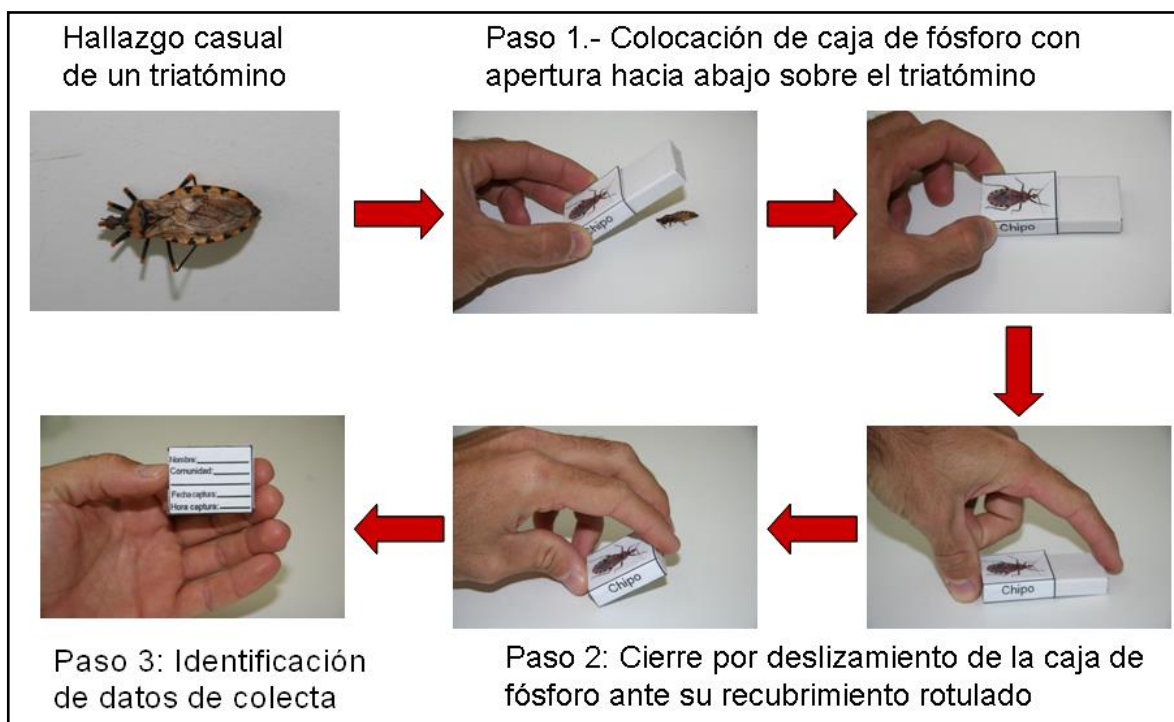


Figura 9. Búsqueda pasiva de triatominos. Captura de triatominos por la comunidad con el método de la caja de fósforo rotulada. Foto Cortesía: Dr. Matías Reyes-Lugo. IMT-UCV.

Los triatominos colectados o suministrados por los habitantes, fueron almacenados en frascos de vidrio; datos como lugar de colecta, hora y sexo del insecto, fueron registrados. Las muestras fueron trasladadas al laboratorio de Biología de Vectores y Parásitos del IZET-UCV para su revisión e identificación mediante claves taxonómicas (Lent y Wygodzinsky, 1979; Soto-Vivas, 2009).

6.2.2. Muestreo de mamíferos

La revisión de los mamíferos domésticos, fue realizada con ayuda del Dr. Tony Chacón, médico veterinario de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la UCV, y pobladores con experticia en el manejo de animales, previo consentimiento informado de los dueños de los animales o habitantes responsables (Anexo 1).

Mamíferos silvestres y peridomésticos, fueron capturados utilizando trampas tipo “National” (Tomahawk livetraps Co. Tomahawk, Wisconsin, U.S.A, Mod.201-40,6x12,7x12,7 cm y Mod 204-50,8x17,9x17,9 cm) para animales de mediano y gran porte, conjuntamente con trampas tipo “Sherman” (Tomahawk livetraps Co, Mod 101-

25,4x7,6x7,6 cm), para roedores, calificadas como trampas que no causan daño para los animales, cebadas con una mezcla de harina de maíz, sardina, cambur, vainilla y frutas (Figura 10).



Figura 10. Tipos de trampas para captura de mamíferos en campo. A). Trampa tipo National; B) Trampa tipo Sherman. Fotos: Lozano-Arias, D.

Las trampas fueron ubicadas en transectas de doble fila de 20 m de ancho, separadas entre sí por 10 m y ubicadas en un radio de 20 m desde las viviendas o en áreas verdes y montañosas aledañas de las zonas referidas no más allá de los 50 m en diámetro, dichas trampas fueron instaladas desde las 6 pm hasta las 6 am del siguiente día, con el propósito de conocer la prevalencia de mamíferos por la zona (Herrera y Urdaneta-Morales, 1992; Herrera y col., 2005). Los animales capturados fueron registrados fotográficamente para su identificación con ayuda de expertos mastozoólogos y aplicación de claves taxonómicas (Eisenberg, 1989; Sánchez y Lew, 2010).

A todos los mamíferos capturados, se les determinaron parámetros como edad, sexo, talla, peso y los lugares de muestreo, los cuales fueron georeferenciados a través de un equipo de posicionamiento global Garmim III GPS (Garmin International, Olathe, KS Global Positioning System). Los datos fueron registrados en una planilla de campo (Anexo 2).

A cada ejemplar capturado se le realizó un xenodiagnóstico, el cual consistió en colocar sobre el cuerpo del animal un frasco de vidrio con tapa de tul que contenía en su interior entre 10 a 20 ninfas de III ó IV estadio de la especie *R. prolixus*, comprobadamente sanos y

criados en el laboratorio de Biología de Vectores y Parásitos (IZET-UCV), para su completa ingurgitación con sangre del mamífero y posterior seguimiento del desarrollo de hemoflagelados en el tracto intestinal de los insectos por microscopia de luz (400x), hasta seis meses posterior a la ingurgitación (Gómez-Núñez y Fernández, 1963; Perlowagora-Szumlewicz y Moreira, 1994; Herrera y col., 2005).

Los mamíferos capturados en ecótopos silvestres y peridomésticos, fueron sedados con ketamina® intramuscular a razón de 10mg/Kg de peso para toma de muestra de sangre por punción cardíaca y siembra esteril en medio de cultivo agar sangre difásico NNN (Novy, Nicolle y McNeal) para posible aislamiento, mediante revisión interdiaria de los cultivos por hasta seis meses post siembra (Herrera y col., 2005). Cada ejemplar fue marcado y liberado al pasar el efecto anestésico.

En particular a los didelfideos capturados además de realizarles el procedimiento descrito anteriormente, se les realizó la exploración del contenido de las glándulas anales por compresión manual; la muestra obtenida fue mezclada con solución salina isotónica (0,85%) y observada al microscopio (400X) en búsqueda de flagelados compatibles con *T. cruzi* (Deane y col., 1986; Herrera y col., 2005).

Los muestreos de mamíferos fueron realizados dos veces/año en cada región a razón de 3 días por visita con un esfuerzo de captura de 4 horas/hombre/noche

Para comparación de los resultados fueron utilizados aislados de *T. cruzi* obtenidos de vectores y mamíferos de Venezuela, previamente identificados por ecótopos y región geográfica, y mantenidos en el sistema vector-parásito-hemocultivo en el cepario de la sección de Biología de Trypanosomatideos del laboratorio de Biología de Vectores y Parásitos del IZET-UCV (Contreras, 1994).

6.3. Determinación de infección y aislamiento de los parásitos.

La presencia, identificación y aislamiento de los parásitos en los mamíferos y triatomíneos muestreados, fue realizado mediante los protocolos de Barretto (1979), Contreras (1994); WHO (2001) y Ferrer y col, (2009).

Los triatominos colectados en el área o entregados por los habitantes fueron destinados para la revisión interdiaria de las heces y del tracto digestivo, en solución isotónica estéril (0,85%) para la búsqueda de flagelados compatibles con morfotipos de *T. cruzi* (microscopio 400X). Este procedimiento también fue realizado a los triatominos experimentales del xenodiagnóstico, a partir de los 7 días post ingesta; todo el material fue revisado por hasta 6 meses.

La hemolinfa y las glándulas salivales de los triatominos fueron revisadas para descartar *Trypanosoma rangeli*, mediante extracción de fluido hemolinfático del tarso inferior de una de las patas traseras, y estimulación a la salivación por contacto con calor sobre un ratón de laboratorio para su observación de estos fluidos al microscopio óptico (400X). Opcionalmente se realizó la disección de glándulas salivales sobre la cuarta parte de la población de triatominos analizada (D'Alessandro y Saravia, 1992).

6.4. Caracterización biológica de los aislados de *Trypanosoma cruzi*

Las muestras de heces de triatominos positivas a flagelados compatibles morfológicamente con *T. cruzi*, fueron examinadas al microscopio (400X), los tripomastigotes metacíclicos fueron cuantificados según el método modificado de Brener (1962), para ser inoculadas por vía i.p. en ratones albinos *Mus musculus* machos de la cepa NMRI de 10 gr, a razón de 200 metacíclicos/gr peso del ratón (inóculo de baja virulencia según protocolo de Herrera y col., 2004). Este protocolo fue realizado para el seguimiento de la cinética de infección y determinación del parasitismo tisular, en los aislados que cumplían con el inóculo requerido. En más detalle, la parasitemia fue medida en sangre obtenida de la vena de la cola de los ratones infectados, siguiendo el método de Brener (1962), a partir del tercer día post-inoculación y con toma de muestra interdiaria hasta la cronicidad o mortalidad de los ratones, identificándose cuatro parámetros de la cinética de infección:

- **Período prepatente (PP):** tiempo medido en días desde el día de la inoculación hasta el primer día de aparición de parásitos en sangre por el método de Brener (1962);

- **Período de infección patente (PIP):** tiempo en días entre el PP y la desaparición de parásitos en sangre por el método de Brener (1962);
- **Máxima parasitemia (MP):** valor máximo de parásitos cuantificados durante el PIP. En base a este parámetro fue evaluada la virulencia de los aislados, entendiéndose como la capacidad que tiene un parásito de multiplicarse en un hospedador, en este caso en el modelo murino, la cual puede ser alta, moderada o baja dependiendo de la cantidad de parásitos cuantificados durante la infección en los ratones,
- **Mortalidad (%M):** cantidad de ratones muertos producto de la infección y expresado en porcentaje.

En el punto de máxima parasitemia cuando se observó la sintomatología externa en los ratones (hirsutismo, distensión por posible hepatoesplenomegalia, urinación espontánea, miembros posteriores parapléjicos), se realizó un xenodiagnóstico a los ratones para la recuperación del aislado y cierre del ciclo del parásito (Brener, 1962; Herrera y col., 2004) y se extrajo de cada ejemplar, 0,5 ml de sangre por punción cardíaca para ser sembrada asépticamente en medio NNN “Medio de Novy, McNeal, Nicolle” (Agar sangre 14%, tripticasa 0,5 %; agar base 0,5%, NaCl 0,6%, suplementado con Gentamicina 100 µg/ml) a fin de cultivar los aislados para su posterior caracterización genotípica, con un máximo de 5 pasajes en el sistema de mantenimiento triatomino-ratón-triatomino por cada aislado, para evitar selección de subpoblaciones del parásito (Deane y col., 1984).

Este protocolo fue realizado también en ratones NMRI inoculados con material de medios de cultivos NNN de los aislados del cepario de la sección de Biología de Trypanosomatideos del Laboratorio de Biología de Vectores y Parásitos (IZET-UCV), escogidos para comparación.

6.5. Estudio del parasitismo tisular

Para establecer el parasitismo a nivel tisular de los aislados evaluados en el modelo murino, fue sacrificado el ratón que presentó la mayor parasitemia mediante dislocación

cervical, de acuerdo con las pautas señaladas por el Código de Bioética del FONACIT (CEBioBio, 2008).

De cada ratón sacrificado se extrajeron muestras de corazón, músculo esquelético, intestino delgado, riñón, bazo, hígado, pulmón, páncreas y cerebro, las cuales fueron fijadas en formol neutro amortiguado al 10%, posteriormente embebidas en parafina y cortadas en micrótomos a 3 µm de espesor, para ser finalmente teñidas con hematoxilina-eosina (H/E) (Nai y col, 2004).

Los cortes histológicos fueron examinados al microscopio (400X y 1000X) para determinar la presencia de nidos o pseudoquistes de parásitos; el grado de histotropismo fue establecido de 0 a 4, teniendo en cuenta el número de nidos o pseudoquistes/50 campos visual a 400X siguiendo el siguiente criterio (Watkins 1966):

- Parasitismo intracelular ausente (-); grado 0
- Parasitismo intracelular escaso (+) con 1-10 nidos de parásitos/50 campos; grado 1
- Parasitismo intracelular moderado (++) con 11-30 nidos/50 campos; grado 2
- Parasitismo intracelular abundante (+++) con 30-60 nidos/50 campos; grado 3
- Parasitismo intracelular intenso (+++++) con >60 nidos/50 campos; grado 4

6.6. Caracterización genotípica de los aislados de *Trypanosoma cruzi*

6.6.1. Extracción de ADN

La extracción de ADN de los aislados de *T. cruzi* fue realizada mediante el kit de purificación Wizard Genomic® de Promega, siguiendo las instrucciones de la casa comercial. En un tubo eppendorf de 1,5 ml fueron colocados 200 µl de la muestra problema (heces de triatominos en solución salina o medio de cultivo de parásitos), se adicionó 400 µl de solución de lisis celular invirtiendo de 5 a 6 veces; luego se centrifugó a 13000 rpm por 1 minuto y se descartó el sobrenadante. Seguidamente se agregaron 400 µl de solución de lisis nuclear y se incubó a 37°C de 15 a 30 minutos, posteriormente se adicionaron 100 µl de Acetato de Amonio 7,5 M para precipitación de proteínas, mezclando por inversión durante 10 a 20 segundos; la muestra fue colocada en hielo por 5 minutos y centrifugada a 13000 rpm durante 4 minutos a temperatura ambiente. El sobrenadante se transfirió a un

nuevo tubo de 1,5 ml y se adicionó 600 µl de isopropanol, para posterior mezcla por inversión y centrifugación a 13000 rpm por 1 minuto a temperatura ambiente.

El sobrenadante fue descartado cuidadosamente, dejando una pequeña cantidad en el fondo; posteriormente se adicionó 600 µl de etanol al 70% (preferiblemente frío), mezclando suavemente por inversión para lavar el ADN; seguidamente la muestra fue centrifugada a 13000 rpm por 1 minuto y el etanol fue totalmente descartado. El tubo se dejaba secar para la total evaporación del etanol restante y el material era resuspendido en 50 µl de solución de rehidratación o tampón TE. Finalmente el ADN fue refrigerado (2 a 8°C) para su posterior evaluación de integridad, cuantificación y análisis.

6.6.2. Evaluación de integridad y cuantificación del ADN

El ADN extraído fue cuantificado en el espectrofotómetro NanoDrop 2000-ThecnoScientific, por medición de la absorbancia a 260 nm (A_{260}) y 280 nm (A_{280}) en una dilución 1/10 en agua Milli-Q. Las conversiones utilizadas fueron las siguientes: 1 unidad de DO es equivalente a 50 µg de ADN/ml de solución, empleando la siguiente fórmula:

$$[\text{ADN}] = (A_{260}) \times D \times 50 \text{ ug/ml} \quad \text{D: Factor de dilución}$$

El grado de pureza fue calculado estableciendo la relación de las absorbancias de las unidades de densidad óptica (DO) 260/280 nm, considerando como aceptables los valores entre 1,8 y 2,0.

La integridad del ADN fue corroborada mediante electroforesis en gel de agarosa al 0,8% a 80V, en *buffer* TAE 1X (0,04 M Trisma Ácido acético, 0,001 M EDTA) durante 45 minutos. El gel fue teñido con bromuro de etidio (0,5 µg/ml) y el ADN fue visualizado con luz ultravioleta mediante el sistema Gel Doc 1000 de BioRad.

6.6.3. Diagnóstico molecular

Las muestras del parásito obtenidas tanto de mamíferos como de triatominos, positivas o no mediante las pruebas parasitológicas, fueron evaluadas para confirmar la presencia de ADN de *T. cruzi*; basado en la amplificación de la secuencia del ADN de los mini círculos del kinetoplasto (kDNA), empleando los cebadores **121** (5'AAATAATGTACGGG(T/G)GAGATGCATGA3') y **122** (5'GGTTCGATTGGGGTTGGTGTAATATA3'). La reacción de amplificación fue realizada con un volumen final de 25 µl, utilizando *buffer GoTaq Flexi* (Promega) (Tris HCl 50 mM, pH 9,0; NaCl₂ 50 mM), MgCl₂ 2mM, Oligos 121 y 122 (0,4 µM), dNTPs 0,2 mM, ADN polimerasa *GoTaq Flexi* (Promega) 1U y ADN molde 10 µl (≈20 ng), amplificado en un termociclador (C1000 BioRad) con desnaturalización inicial a 94°C por 10 minutos, 30 ciclos de desnaturalización a 94°C por 1 minuto, hibridación a 63°C por 1 minuto, extensión 72°C por 1 minuto y extensión final a 72°C por 10 minutos. Los productos de amplificación de 330 pb indicaron la presencia de ADN de *T. cruzi* (Britto y col., 1993; Wincker y col., 1994).

6.6.4. Marcadores moleculares de variabilidad genética.

Las muestras que presentaron amplificación de ADN de *T. cruzi* por PCR (kDNA), fueron evaluadas para determinar la presencia de variabilidad genética, mediante la amplificación por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de los siguientes marcadores: 1). Regiones del espaciador no transcrito del gen del mini-exón, para tener una aproximación sobre los principales genotipos (TcI, TcIII y TcIV) según lo planteado por Fernández y col., (2001); 2). Regiones codificantes para las subunidades grande (24Sα rDNA) y pequeña (18S rDNA) del ADN ribosomal, a fin de establecer diferencias entre los genotipos TcI y TcIV, según el algoritmo de Brisse y col., 2001 (Tabla 2).

Tabla 2. Marcadores moleculares de variabilidad genética. Marcadores utilizados para identificar los genotipos de los aislados de *Trypanosoma cruzi* obtenidos de triatomíneos y mamíferos de diferentes complejos ecopatogénicos de la Tripanosomiasis Americana en Venezuela.

Mini-exón Fernández y col.; (2001)	Cebadores: ME (5'-TAC CAA TAT AGT ACA GAA ACTG-3') TC1 (5'-ACA CTT TCT GTG GCG CTG ATCG-3') TC2 (5'-TTG CTC GCA CAC TCG GCT GCAT-3') TC3 (5'-CCG CGW ACA ACC CCT MAT AAA AATG-3'). Reacción de amplificación: Volumen final 25 µl: <i>BufferGoTaq Flexi</i> (Promega) (Tris HCl 50mM, pH 9 NaCl₂ 50mM), MgCl₂ 2mM, Oligos MC, TC1, TC2, TC3 (0,4 µM), dNTPs 0,2 mM, ADN polimerasa <i>GoTaq Flexi</i> (Promega) 1U y ADN molde 10 µl (≈20ng). Programa: Desnaturalización inicial: 94°C, 5 min. 35 ciclos: desnaturalización 94°C, 30 sec; hibridación 50°C, 30sec; Extensión 72°C, 30sec; Extensión final 72°C, 5min. Productos (genotipos): Banda 250 pb (TcIV); Banda 200 pb (TcI); Banda 150 pb (TcIII)
24Sa rDNA Souto y col., (1996) Brise y col., (2001)	Cebadores: D71 (5'-AAG GTG CGT CGA CAG TGT GG 3') D72 (5'-TTT TCA GAA TGG CCG AAC AGT-3'). Reacción de amplificación: Volumen final 25 µl: <i>BufferGoTaq Flexi</i> (Promega) (Tris HCl 50mM, pH 9NaCl 50mM), MgCl₂ 2mM, Oligos D71, D72 (0,4 µM), dNTPs 0,2 mM, ADN polimerasa <i>GoTaq Flexi</i> (Promega) 1U y ADN molde 10 µl (≈20 ng). Programa: Desnaturalización inicial: 94°C, 5 min. 30 ciclos: desnaturalización 94°C, 1 min; hibridación 60°C, 1 min; Extensión 72°C, 1 min; Extensión final 72°C, 5min. Productos (genotipos): Banda de 110 pb (TcI, TcIII y TcV), 125 pb (TcII, TcIV y TcVI).
18SrDNA Souto y col.,(1996) Brise y col., (2001)	Cebadores: V1 (5'-CAA GCG GCT GGG TGG TTA TTC CA-3') V2 (5'-TTG AGG GAA GGC ATG ACA CAT GT-3') Reacción de amplificación: Volumen final 25 µl:<i>BufferGoTaqFlexi</i> (Promega) (Tris HCl 50mM, pH 9; NaCl 50mM), MgCl₂ 2mM, Oligos V1 y V2 (0,4 µM), dNTPs 0,2 mM, ADN polimerasa <i>GoTaqFlexi</i> (Promega) 1U y ADN molde 10 µl (≈20 ng). Programa: Desnaturalización inicial: 94°C, 5 min. 30 ciclos: desnaturalización 94°C, 1 min; hibridación 50°C, 1 min; Extensión 72°C, 1 min; Extensión final 72°C, 5min. Productos (genotipos): Banda de 175 pb (TcI) , 165 pb (TcII, TcIII y TcV), 155 pb (TcIV)

Para confirmar los genotipos TcI, TcII, TcIII y TcIV de los aislados obtenidos y conocer las diferencias intraespecíficas, se procedió a hacer el análisis de los polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción (PCR-RFLPs), mediante la utilización de enzimas de restricción, empleando la metodología planteada por Westenberger y col, (2005) y Lewis y col, (2009). Para ello se utilizaron los cebadores **HSP60_For** (5'CGCCGTTTTTCTCAGACACA3')y **HSP60_Rev**(5'TTCTCGTTCACCTCCACCTC3'), **GPI_For**(5'-GGCATGTGAAGCTTTGAGGCCTTTTTCAG-3')y**GPI_Rev**(5'TGTAAGGGCCCAGTGAGAGCGTTGGTTTGAATAGC-3'), **H1_For** (5'TGAAGAAGGC GCCGAAGAAG3') y **H1_Rev**(5'GCCTTCTTGG GCGGAACGGC3'). La reacción de amplificación fue realizada con un volumen final de 50 µl utilizando *Buffer GoTaq Flexi* (Promega) (Tris HCl 50mM, pH 9; NaCl 50mM), MgCl₂ 2mM, dNTPs 0,4 mM, ADN polimerasa *GoTaq Flexi* (Promega) 1U, ADN muestra 10 µl (≈20 ng) y los Oligos respectivos para cada reacción: *HSP60_For*, *HSP60_Rev*, *GPI_For*, *GPI_Rev*, *H1_For* y *H1_Rev* (0,2 µM). El protocolo de amplificación se realizó en un termociclador (C1000 BioRad) y consistió en una desnaturalización inicial a 94°C durante 3 minutos, seguida de 4 ciclos (94°C por 30 segundos, 64°C por 30 segundos y 72°C por 1 minuto), continuando con 28 ciclos de desnaturalización 94°C por 30 segundos, hibridación 60°Cpor 30 segundos, extensión 72°C por 1 minuto y extensión final 72°C por 10 minutos.

Seguidamente a los productos obtenidos de la amplificación anterior, se les realizó la digestión con las enzimas de restricción para cada marcador *EcoRV* (HSP60), *HhaI* (GPI) y *AatII* (H1). La mezcla de reacción enzimática estuvo constituida por 10 µl del producto de PCR (1 µg aproximadamente), 0,25U de la enzima de restricción según el caso, 100 ng/µl BSA, la cantidad *buffer* 1X de la enzima correspondiente y agua destilada hasta obtener un volumen final de 20 µl. La reacción de digestión fue incubada durante 4 horas a 37°C. Los productos esperados son descritos en la Tabla 3.

Tabla 3. Patrón de bandas en pares de bases de los genotipos de *Trypanosoma cruzi* establecidos mediante ensayos de PCR-RFLP (Lewis y col, 2009).

Genotipos	Marcador/Enzima (pb)		
	HSP60/EcoRV	HistonaH1/AatII	GPI/HhaI
TcI (<i>T. cruzi</i> I)	432-462 (432/462)	486 (364 + 122)	1.264 (817 + 447)
TcIIa (<i>T. cruzi</i> IV)	432-462 (432/462)	486 (364 + 122)	1.264 (490 + 447 + 253)
TcIIb (<i>T. cruzi</i> II)	432-462 (432/462)	486 (486)	1.264 (490 + 447 + 253)
TcIIc (<i>T. cruzi</i> III)	432-462 (314 + 148/314+118)	486 (364 + 122)	1.264 (817 + 447)
TcIIId (<i>T. cruzi</i> V)	432-462 (314 + 148/314+118)	486 (364 + 122)	1.264 (817 + 490 + 447 + 253)
TcIIe (<i>T. cruzi</i> VI)	432-462 (314 + 148/314+118)	486 (364 + 122)	1.264 (817 + 490 + 447 + 253)

6.6.5. Verificación de los productos de PCR.

La electroforesis en geles de agarosa se llevó a cabo según el procedimiento descrito por Sambrook y Russell (2001), para evidenciar los productos de las PCRs. La electroforesis fue realizada en geles de agarosa (Agarose Ultra pure Sigma®) al 2% para todos los casos (kDNA, mini-exón, 24Sα, 18S rDNA y RFLPs, utilizando TAE (Tampón Tris Acetato 40 mM, EDTA 0,5 M pH 8,0) en cámara para electroforesis horizontal y en condiciones de corrida de 80-100V. Los geles fueron teñidos con bromuro de etidio (0,5 µg/ml).

Las bandas de ADN fueron visualizadas con luz ultravioleta mediante el sistema Gel Doc 1000 de BioRad. El tamaño de los productos de las PCRs fue estimado mediante comparación del patrón de bandas del marcador de tamaño molecular 100 pb (Promega®) o 100 pb Hypperladder IV (Axygen®).

6.7. Análisis estadístico.

Para estudiar las diferencias e igualdad de distribución en los parámetros de la cinética de infección (PP, PIP, MP y %M) de los aislados de *T. cruzi*, obtenidos de triatomíneos y mamíferos en ambas regiones geográficas, fueron aplicados los test de igualdad de medias (T-test), igualdad de varianzas (F-test), igualdad de distribuciones (Kolmogorov-Smirnov) y diagramas de caja (*Blox plot*), usando el *Software* estadístico PAST versión 3.12.

Mediante análisis de componentes principales (ACP) con MVSP versión 3.0, fueron evaluadas las prevalencias de las variables del comportamiento biológico de los aislados.

7. Resultados

7.1. Estudio de hospedadores y su positividad a *Trypanosoma cruzi*

7.1.1. Triatominos

De los diferentes muestreos fueron obtenidos 205 triatominos, de los cuales 133 se colectaron en la región Oriental (69 Machos, 61 Hembras, 3 Ninfas V) y 72 individuos para la región Centro-Occidental (23 Machos y 49 Hembras). Las especies de triatominos colectadas fueron identificadas de acuerdo a Lent & Wigodzensky (1979) como *Triatoma maculata*, *Rhodnius prolixus*, *Panstrongylus geniculatus*, *Rhodnius pictipes*, *Psanmolestes arthuri* y *Eratyrus cuspidatus* (Tabla 4; Figura 11).

La especie de triatominos que presentó el mayor porcentaje de individuos colectados fue *P. geniculatus* (49,8%), seguida de *T. maculata* (40,9%), *R. prolixus* (5,8%), *R. pictipes* y *Ps. arthuri* (1,5% c/u) y finalmente *E. cupidatus* (0,5%), siendo la región Oriental quien presentó el mayor número de triatominos muestreados; sin embargo, *P. geniculatus* fue la especie predominante para la región Centro-Occidental y *T. maculata* para la región Oriental (Tabla 4).

En general, la prevalencia de triatominos positivos a *T. cruzi* fue de 62,4% para la región Oriental y de 70,8% para la región Centro-Occidental, sin embargo la revisión de las muestras mediante la combinación de dos métodos (Heces+PCR) fue la que permitió establecer el mayor porcentaje de positividad (70,1%) en los triatominos, independientemente de su especie y región geográfica. De la totalidad de triatominos positivos para *T. cruzi*, el 28.4% fue empleado para la caracterización biológica de los aislados en modelo murino (Tabla 4).

Tabla 4. Diversidad de especies de triatominos muestreados en las regiones Oriental y Centro-Occidental de Venezuela y su positividad para *Trypanosoma cruzi*.

Especie de Triatomo	N° de muestras	Región Geográfica		Positivos		Diagnostico Morfobiológico /Molecular		N° de INC
		CO	ORT	CO	ORT	1 MT	2 MT	
<i>Eratyrus cuspidatus</i>	1 (0,5%)	0	1 (1H)	0/0	1/1	0/1	1/1	1/1
<i>Panstrongylus geniculatus</i>	102 (49,8%)	67 (20M/47H)	35 (18M/17H)	49/67	23/35	7/72	65/72	25/72
<i>Psanmolestes arthuri</i>	3 (1,5%)	0	3(3H)	0/0	2/3	1/2	1/2	1/2
<i>Rhodnius prolixus</i>	12 (5,8%)	2 (1M/1H)	10 (4M/6H)	2/2	8/10	0/10	10 /10	8 /10
<i>Rhodnius pictipes</i>	3 (1,5%)	0	3 (2M/1H)	0/0	3/3	2/3	1/3	1/3
<i>Triatoma maculata</i>	84 (40,9%)	3 (2M/1H)	81 (45M/33H/3N)	0/0	46/81	30/46	16/46	2 /46
Total	205	72 (35,1%)	133 (64,9%)	51/72 (70,8%)	83/133 (62,4%)	40/134 (29,9%)	94/134 (70,1%)	38 /134 (28,4%)

CO: Centro-Occidental; ORT: Oriental; 1 MT: 1 método (PCR); 2 MT: 2 métodos (Heces-contenido intestinal de triatominos de campo o de xenodiagnóstico y PCR).INC: Inoculados



Figura 11. Fotografías de las especies de triatominos encontrados en las regiones Oriental y Centro-Occidental de Venezuela.A) *Rhodnius prolixus*; B) *Rhodnius pictipes*; C) *Triatoma maculata*; D) *Panstrongylus geniculatus*; E) *Psanmolestes arthuri*; F) *Eratyrus cuspidatus*. Fotos: Lozano-Arias D.

7.1.2. Mamíferos

En relación al proceso de muestreo de mamíferos, se obtuvo un total de 255 ejemplares, de los cuales 83 individuos se obtuvieron en la región Oriental (48 machos y 35 hembras) y 172 en la región Centro-Occidental (84 machos y 88 hembras). En ambas regiones geográficas fueron encontrados individuos de diferentes edades, desde cachorros (15 individuos), juveniles (57 individuos) hasta adultos (183 individuos). Todos los mamíferos fueron identificados en lo posible hasta la categoría de especie mediante las claves taxonómicas de Eisenberg (1989), Sánchez y Lew (2010) y con el apoyo del médico veterinario Dr. Tony Chacón (Catedra de Semiología Facultad de Ciencias Veterinarias UCV).

La especies encontradas fueron: *Canis familiaris* (52,16%), *Didelphis marsupialis* (18,04%), *Equus asinus* (9,41%), *Rattus rattus* (5,49%), *Bos taurus* (3,53%), *Equus asinus* x *Equus caballus* (3,14%), *Equus caballus* (1,96%), *Rhipidomys couesi* (1,18%), *Cercopithecus thomasi* y *Cuniculus paca* (0,78%), *Dasyprocta novemcinctus*, *Desmodus rotundus*, *Odontomys margaritae*, *Odontomys virginianus*, *Sus scrofa* y *Tamandua tetradactyla* (0,39% c/u); siendo *C. familiaris* y *D. marsupialis* las especies más representativas en ambas regiones geográficas (Tabla 5; Figura 12).

Así mismo, la positividad de estos mamíferos a *T. cruzi* fue de 43,4% en la región Oriental y el 29,6% en la región Centro-Occidental, la cual fue establecida por métodos parasitológicos y moleculares (PCR-kDNA). La caracterización biológica fue realizada únicamente al 26,4% de los aislados positivos (23/87), los cuales cumplían con el número de metacíclicos requeridos (200 met/gr de peso) por inóculo (Tabla 5).

Tabla 5. Diversidad de las especies de mamíferos muestreados en las regiones Oriental y Centro-Occidental de Venezuela y su positividad para *Trypanosoma cruzi*.

Especie hospedador	N° de muestras	Región Geográfica		Positivos		Diagnóstico Morfobiológico/Molecular				N° de INC
		CO	ORT	CO	ORT	1 MT	2 MT	3 MT	4 MT	
<i>Bos taurus</i> (Toro-Vaca)	9(3,5%)	0	9 (3M/6H)	0/0	3/9	3/3	0/3	0/3	0/3	0/3
<i>Canis familiaris</i> (Perro doméstico)	133(52,2%)	110(49M/61H)	23 (16M/7H)	24/110	10/23	34/34	0/34	0/34	0/34	0/34
<i>Cerdocyon thous</i> (Zorro de monte)	2 (0,8%)	0	2 (2M)	0/0	1/2	0/1	0/1	0/1	1/1	1/1
<i>Cuniculus paca</i> (Lapa)	2 (0,8%)	0	2 (2H)	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
<i>Dasyus novemcinctus</i> (Armadillo)	1 (0,4%)	0	1 (1H)	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
<i>Desmodus rotundus</i> (Murcielago/Vampiro)	1 (0,4%)	0	1(1M)	0/0	1/1	0/1	0/1	0/1	1/1	1/1
<i>Didelphis marsupialis</i> (Rabipelado)	46 (18,0%)	26 (12M/14H)	20 (8M/12H)	12 /26	11/20	6/23	11/23	4/23	2/23	16/23
<i>Equus asinus</i> (Burro)	24 (9,4%)	18 (13M/5H)	6 (5M/1H)	10/18	4/6	13/14	1/14	0/14	0/14	1/14
<i>Equus caballus</i> (Caballo)	5 (2,0%)	0	5 (4M/1H)	0/0	1/5	1/1	0/1	0/1	0/1	0/1
<i>Equus asinus</i> x <i>Equus caballus</i> (Mula)	8 (3,1%)	8 (3M/5H)	0	2/8	0/0	2 /2	0/2	0/2	0/2	0/2
<i>Odocoileus margaritae</i> (Venado enano de margarita)	1 (0,4%)	0	1 (1H)	0/0	1/1	0/1	0/1	0/1	1/1	1/1
<i>Odocoileus virginianus</i> (Venado enano de Margarita)	1 (0,4%)	0	1 (1H)	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
<i>Pecari tajacu</i> (Baquiro-Cerdo de monte))	3 (1,2%)	0	3 (1M/2H)	0/0	1/3	0/1	0/1	0/1	1/1	1/1
<i>Rattus rattus</i> (Rata común)	14(5,5%)	10 (7M/3H)	4 (4M)	3/10	2/4	3/5	1/5	1/5	0/5	2/5
<i>Rhipidomys couesi</i> (Rata escaladora)	3 (1,2%)	0	3 (2M/1H)	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
<i>Sus scrofa</i> (Cerdo)	1 (0,4%)	0	1 (1M)	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
<i>Tamandua tetradactyla</i> (Oso melero)	1 (0,4%)	0	1(1M)	0/0	1/1	1/1	0/1	0/1	0/1	0/1
Total	255	172 (67,4%)	83 (32,6%)	51/172 (29,6%)	36/83 (43,4%)	64/87 (73,6%)	13/87 (14,9%)	7/87 (8,0%)	3/87 (3,5%)	23/87 (26,4%)

CO: Centro-Occidental; ORT: Oriental; 1MT: 1 método (PCR); 2MT: 2 métodos (Heces-contenido intestinal de triatomos de campo o de xenodiagnóstico y PCR/Hemocultivo y PCR); 3MT: 3 métodos (sangre fresca+heces-contenido intestinal triatomos de xenodiagnóstico+PCR/ heces-contenido intestinal triatomos de xenodiagnóstico+Glándulas anales+PCR); 4 métodos: (sangre fresca+heces-contenido intestinal triatomos de xenodiagnóstico+hemocultivo+PCR). INC: Número de aislados inculados inoculados



Figura 12. Fotografías de algunas especies de mamíferos encontrados en las regiones Oriental y Centro-Occidental de Venezuela.
 A). *Equus asinus*; B). *Equus caballus*; C). *Canis familiaris*; D). *Bos taurus*, E). *Desmodus rotundus*; F). *Pecari tajacu*, G) *Didelphis marsupialis*, H) *Dasypus novemcinctus*. Fotos: Lozano-Arias, D.

7.2. Caracterización biológica de los aislados de *Trypanosoma cruzi*.

El seguimiento de la dinámica de la infección por *T. cruzi* en el modelo murino, permitió evidenciar heterogeneidad respecto a los parámetros de la cinética de infección tales como periodo prepatente (PP), periodo de infección patente (PIP), máxima parasitemia (MP) y porcentaje de mortalidad (%M) para los diferentes aislados evaluados provenientes de varias especies de triatomíneos y mamíferos en ambas regiones geográficas (Oriental y Centro-Occidental), independientemente del ecótopo donde fueron recolectados (D: Domicilio, PD: Peridomicilio, S: Silvestre).

7.2.1. Aislados de Triatomíneos.

Para la caracterización biológica en el modelo murino de los aislados de *T. cruzi* obtenidos de triatomíneos, fueron seleccionadas 14 muestras de la región Oriental (D: 1, PD: 11 y S:2) y 24 muestras de la región Centro-Occidental (D:2 y PD: 22, no hubo muestras de S), teniendo en cuenta los criterios de selección planteados en la metodología.

El análisis de los parámetros de la cinética de infección, reveló que los valores de **PP** oscilaron entre 7 y 31 días con un promedio de 15 días ($\pm 6,6$ SD) para la región Oriental y entre 4 a 21 días con un promedio de 13 días ($\pm 4,0$ SD) para los aislados de la región Centro-Occidental, sin diferencias estadísticamente significativas entre regiones geográficas ni entre ecótopos ($p > 0,05$), a pesar de observarse variación en el tiempo de inicio de la infección, siendo menor el intervalo en los aislados de la región Centro-Occidental (Tabla 6, Anexos 3 y 4).

Independientemente de la región geográfica los valores de **PP** variaron según la especie de triatómino: *E. cuspidatus* (18 días), *R. prolixus* (15 días), *P. geniculatus* y *T. maculata* (14 días), *R. pictipes* y *P. arthuri* (10 días).

Tabla 6. Parámetros de la cinética de infección evaluados en modelo murino (NMRI) de los aislados de *Trypanosoma cruzi*, obtenidos de triatomíneos en las regiones Oriental y Centro-Occidental de Venezuela.

Aislado	Hospedador	Localidad	EC	SX	PP (Días)	PIP (Días)	MP (Flag/mlx10 ⁴)	% M
REGION ORIENTAL								
TPRX/VE/2006/VP64*	<i>R. prolixus</i>	El Enial	PD	♀	31	10	0,43	33
TPRX/VE/2007/VP78*	<i>R. prolixus</i>	Angostura	S	♂	11	7	25,60	100
TPRX/VE/2009/VP81	<i>R. prolixus</i>	El Enial	PD	♀	13	7	4,69	100
TECUP/VE/2012/VP145	<i>E. cuspidatus</i>	El Enial	PD	♀	18	11	0,64	33
TPRX/VE/2012/VP150	<i>R. prolixus</i>	Naricual	PD	♀	17	16	3,20	100
TGEN/VE/2012/VP151	<i>P. geniculatus</i>	El Maco	PD	♂	7	9	66,13	100
TGEN/VE/2012/VP152	<i>P. geniculatus</i>	El Maco	PD	♀	7	9	111,80	100
TMAC/VE/2012/VP154	<i>T. maculata</i>	Altos de Sucre	PD	♀	10	18	84,80	33
TMAC/VE/2012/VP158	<i>T. maculata</i>	El Enial	PD	♂	19	14	0,64	33
TPRX/VE/2009/VP159	<i>R. prolixus</i>	La Ceiba	S	♀	15	5	1,49	0
TGEN/VE/2011/VP164	<i>P. geniculatus</i>	Yaguaracual	D	♂	22	42	7,36	33
TPICT/VE/2012/VP168	<i>R. pictipes</i>	San José de las Margaritas Llano	PD	♂	10	40	29,76	33
TART/VE/2012/VP169	<i>Ps. arthuri</i>	San José de las Margaritas Llano	PD	♀	10	26	67,52	100
TPRX/VE/2009/VP182	<i>R. prolixus</i>	Puerto la Cruz	PD	♀	17	28	2,56	33
REGION CENTRO-OCCIDENTAL								
TGEN/VE/1996/VP29*	<i>P. geniculatus</i>	Colinas Bello Monte	D	♀	12	31	18,00	67
TGEN/VE/1997/VP31*	<i>P. geniculatus</i>	Colinas Bello Monte	D	♂	21	39	4,48	33
TGEN/VE/2009/VP80	<i>P. geniculatus</i>	Colinas Bello Monte	D	♀	12	23	10,67	100
TGEN/VE/2009/VP82	<i>P. geniculatus</i>	Hoyo de la Puerta	D	♀	12	7	1,07	33

TGEN/VE/2009/VP85	<i>P. geniculatus</i>	Petare	D	♀	18	33	15,00	100
TGEN/VE/2009/VP86	<i>P. geniculatus</i>	Los Palos Grandes	D	♂	9	13	19,20	100
TGEN/VE/2009/VP87	<i>P. geniculatus</i>	La Mariposa	D	♀	16	4	25,17	100
TGEN/VE/2009/VP90	<i>P. geniculatus</i>	Petare	D	♀	10	15	2,65	100
TGEN/VE/2010/VP95	<i>P. geniculatus</i>	Terrazas Club Hípico	D	♀	9	9	1,28	33
TGEN/VE/2010/VP97	<i>P. geniculatus</i>	Araira	D	♀	12	5	5,76	100
TGEN/VE/2010/VP98	<i>P. geniculatus</i>	Petare	D	♀	19	12	2,35	100
TGEN/VE/2010/VP99	<i>P. geniculatus</i>	El Hatillo	D	♀	14	5	4,48	100
TGEN/VE/2010/VP100	<i>P. geniculatus</i>	Caricuao	D	♀	14	5	4,48	100
TGEN/VE/2010/VP110	<i>P. geniculatus</i>	Cotiza	D	♂	13	18	0,64	100
TGEN/VE/2011/VP121	<i>P. geniculatus</i>	Caricuao	D	♂	17	15	5,12	67
TGEN/VE/2010/VP122	<i>P. geniculatus</i>	Petare	D	♂	14	11	1,10	33
TPRX/VE/2010/VP129	<i>R. prolixus</i>	Jabillal Abajo	PD	♂	4	38	11,10	33
TGEN/VE/2010/VP134	<i>P. geniculatus</i>	La Pastora	D	♀	18	5	117,12	100
TGEN/VE/2012/VP146	<i>P. geniculatus</i>	Colinas Bello Monte	D	♂	14	13	12,0	67
TPRX/VE/2010/VP148	<i>R. prolixus</i>	Jabillal Abajo	PD	♀	12	21	3,20	33
TGEN/VE/2012/VP155	<i>P. geniculatus</i>	El Cafetal	D	♀	10	9	123,5	100
TGEN/VE/2014/VP171	<i>P. geniculatus</i>	Colinas bello monte	D	♀	13	56	1,49	33
TGEN/VE/2014/VP176	<i>P. geniculatus</i>	Macaracuay	D	♂	9	27	67,20	100
TGEN/VE/2014/VP186	<i>P. geniculatus</i>	Avenida Panteón	D	♂	20	42	6,08	33

EC: ecótopo (D: doméstico, PD: Peridoméstico, S: silvestre); SX: sexo (♂: macho; ♀: hembra); PP: Periodo prepatente; PIP: Periodo de infección patente; MP: máxima parasitemia; %M: porcentaje de mortalidad. * Aislados de referencia caracterizados anteriormente en el laboratorio de Biología de tripanosomatídeos-UCV.

Los valores de **PIP** para los aislados de la región Oriental oscilaron entre 5 a 42 días con promedio 17 días ($\pm 12,2$ SD) y entre 4 a 56 días con promedio de 19 días ($\pm 14,2$ SD) para los de la región Centro-Occidental, lo que reflejó un mayor tiempo de circulación de los parásitos en los aislados de la región Centro-Occidental, aunque no significativa en relación a la región Oriental ($p > 0,05$). La infecciones producidas fueron menores a sesenta días, bien sea por la mortalidad causada por el aislado o bien por el deterioro conducente a mortalidad que conllevo a decidir la eutanasia (Tabla 6, Anexo 3 y 4).

En orden descendente los valores de **PIP** según la especie de triatmino fue *R. pictipes* (40 días), *P. arthuri* (26 días), *P. geniculatus* y *T. maculata* (18 días), *R. prolixus* (17 días), *E. cuspidatus* (11 días).

Respecto a la **MP** para los aislados de triatominos de la región Oriental los valores fueron de 0,43 a $111,80 \times 10^4$ flag/ml de sangre con promedio de $29,04 \times 10^4$ ($\pm 37,7$ SD) y para la región Centro-Occidental dicho valor oscilo entre 0,64 y $123,5 \times 10^4$ flag/ml de sangre con promedio de $19,30 \times 10^4$ ($\pm 34,0$ SD), lo que reflejó una mayor virulencia en promedio para los aislados de la región Oriental, sin embargo, dicha variación no fue estadísticamente significativa en relación a los aislados de la región Centro-Occidental y tampoco entre aislados de una misma región ($p > 0,05$).

Según la especie de triatmino los valores promedio de la **MP** en orden descendente fueron *P. arthuri* ($67,52 \times 10^4$ flag/mls sangre), *R. pictipes* ($29,76 \times 10^4$ flag/ml sangre), *P. geniculatus* ($25,37 \times 10^4$ flag/ml sangre), *T. maculata* ($15,95 \times 10^4$ flag/ml sangre), *R. prolixus* ($6,53 \times 10^4$ flag/ml sangre) y *E. cuspidatus* ($0,64 \times 10^4$ flag/ml sangre).

Los valores de **% M** en la región Oriental oscilaron entre 0 a 100% con un promedio de 60% ($\pm 37,4$ SD), siendo el aislado VP159 el único que no presentó mortalidad, mientras que en la región Centro-Occidental se observó una variación entre 33 a 100% con promedio de 74% ($\pm 31,1$) reflejandose mayor patogenicidad de los aislados para esta región, aún cuando no hubo diferencias significativas entre las regiones geográficas ($p > 0,05$) (Tabla 6, Anexos 3 y 4).

De acuerdo con los valores promedio, los aislados del parásito que causaron mayor mortalidad siendo más patógenos en modelo murino, fueron *P. arthuri* (100%), *P. geniculatus* (77%), *T. maculata* (66%), *R. prolixus* (54%), *R. pictipes* y *E. cuspidatus* (33%).

Es importante destacar que a medida que avanzaba el curso de la infección, los ratones iban presentando desordenes en la marcha, urinación, pérdida de motilidad en miembros inferiores, hirsutismo, alopecia y distensión abdominal, reflejando hepatoesplenomegalia.

Al comparar todos los parámetros de la cinética de infección para los aislados de triatominos de ambas regiones geográficas, mediante el análisis de *box plot*, se observó que el parámetro de máxima parasitemia fue el que presentó mayor dispersion en los datos, indicando una variación en la virulencia especialmente en los aislados de la región Oriental (Figura 13).

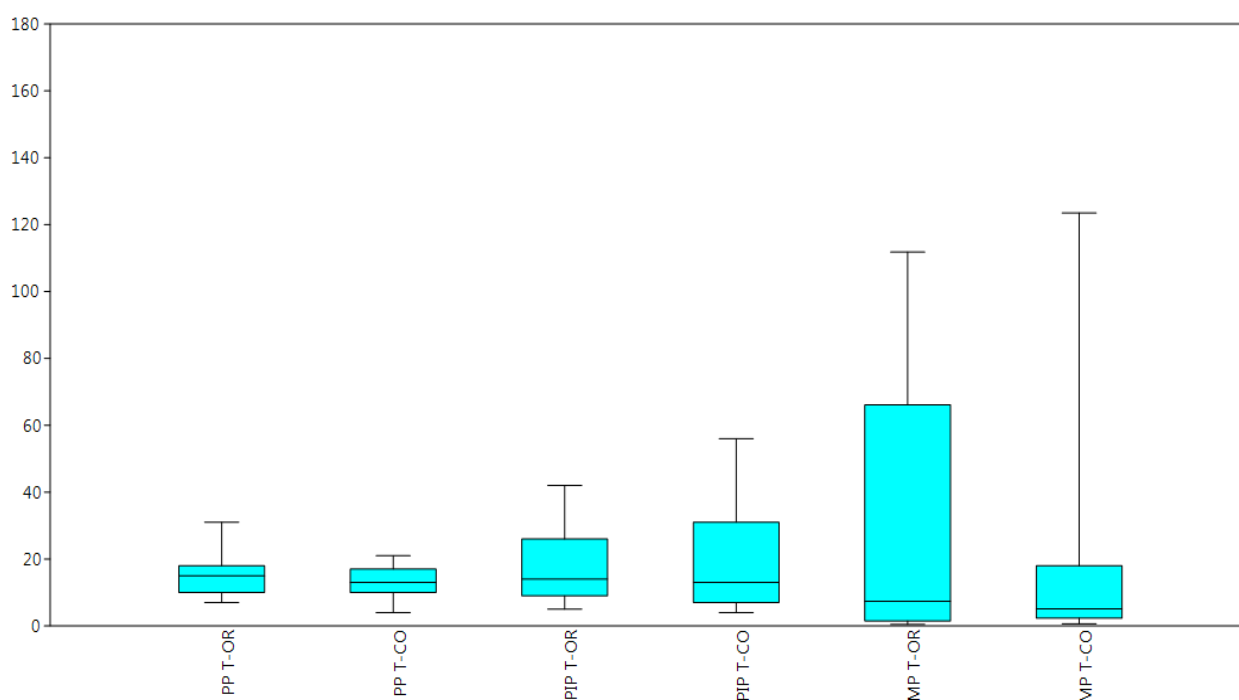


Figura 13. Evaluación de los parámetros de infección mediante diagrama de cajas (*box plot*) de los aislados de *Trypanosoma cruzi* obtenidos de triatominos en las regiones Oriental y Centro-Occidental de Venezuela. PP: periodo prepatente; PIP: periodo de infección patente; MP: máxima parasitemia; T: triatominos; OR: región Oriental; CO: región Centro-Occidental (PAST 3.12).

7.2.2. Aislados de Mamíferos

Para la caracterización biológica en modelo murino de los aislados de *T. cruzi* obtenidos de mamíferos, fueron seleccionadas 13 muestras (PD: 5; S: 8) de la región Oriental y 10 muestras (PD: 6; S: 4) de la región Centro-Occidental, según los criterios planteados en la metodología (Tabla 7).

La cinética de infección reveló valores de **PP** entre 6 a 26 días, con promedio de 14 días ($\pm 5,9$ SD) para los aislados de la región Oriental; parasitemia de 8 a 23 días, con promedio de 15 días ($\pm 4,9$ SD) para la región Centro-Occidental, sin diferencias significativas entre las regiones geográficas ($p > 0,05$) (Tabla 7, Anexos 3 y 4).

Los valores de **PIP** para estos aislados en la región Oriental fluctuaron entre 4 a 34 días con un promedio de 21 días ($\pm 9,4$ SD) y entre 5 a 46 días con un promedio de 19 días ($\pm 12,2$ SD) para la región Centro-Occidental, con heterogeneidad respecto al tiempo de infección entre los aislados, más sin diferencias significativas para ambas regiones geográficas ($p > 0,05$). Así mismo, dependiendo la especie de mamífero, los días de duración de la infección en el modelo murino variaron de la siguiente manera: *P. tajacu* (34 días), *E. asinus* (28 días), *R. rattus* (26 días), *D. marsupialis* y *O. margaritae* (19 días, c/u), *C. thous* (17 días) y *D. rotundus* (12 días).

Respecto a los valores de **MP** para los aislados de la región Oriental estuvieron entre $1,70$ y $30,08 \times 10^4$ flag/ml de sangre con promedio de $9,39 \times 10^4$ ($\pm 8,5$ SD), mientras que para la región Centro-Occidental los valores variaron entre $1,00$ y $15,57 \times 10^4$ flag/ml de sangre con promedio de $4,61 \times 10^4$ ($\pm 4,5$ SD); sin diferencias significativas para ambas regiones geográficas ($p > 0,05$).

Tabla 7. Parámetros de la cinética de infección evaluados en modelo murino NMRI de los aislados de *Trypanosoma. cruzi*, obtenidos de mamíferos en las regiones Oriental y Centro-Occidental de Venezuela.

Aislado	Hospedador	Localidad	EC	SX	PP (Días)	PIP (Días)	MP (Flag/mlx10 ⁴)	% M
REGIÓN ORIENTAL								
MEAS/VE/2009/CD112	<i>E. asinus</i>	Altos de guanta	PD	♂	8	28	10,45	33
MDID/VE/2012/CD113	<i>D. marsupialis</i>	Cambural	PD	♀	18	13	13,00	33
MDID/VE/2009/CD116	<i>D. marsupialis</i>	Puerto la Cruz	PD	♀	10	32	2,35	100
MDID/VE/2009/CD118	<i>D. marsupialis</i>	Bergantín	PD	♂	13	18	5,97	100
MDID/VE/2009/CD120	<i>D. marsupialis</i>	Altos de Guanta	PD	♀	13	22	2,35	100
MDID/VE/2009/CD160	<i>D. marsupialis</i>	El Maco	S	♂	6	33	10,24	100
MDID/VE/2012/CD162	<i>D. marsupialis</i>	Altos de Sucre	S	♀	18	14	30,08	100
MDID/VE/2013/CD164	<i>D. marsupialis</i>	Altos de Sucre	S	♂	26	4	3,20	67
MDID/VE/2013/CD165	<i>D. marsupialis</i>	Los Olivos	S	♂	20	29	1,70	0
MCTH/VE/2012/CD168	<i>C. thous</i>	San José de las Margaritas Llano	S	♂	18	17	12,16	100
MDES/VE/2012/CD170	<i>D. rotundus</i>	El Enial	S	♂	13	12	21,12	100
MODM/VE/2012/CD171	<i>O. margaritae</i>	San José de las Margaritas Llano	S	♀	13	19	7,68	100
MPEC/VE/2012/CD173	<i>P. tajacu</i>	San José de las Margaritas Llano	S	♂	6	34	1,71	33
REGIÓN CENTRO-OCCIDENTAL								
MDID/VE/2009/CO16*	<i>D. marsupialis</i>	Colinas de Bello Monte	PD	♂	16	12	9,00	100
MRAT/VE/1993/CO22*	<i>R. rattus</i>	Colinas de Bello Monte	PD	♂	15	5	5,00	100
MDID/VE/1995/CO75*	<i>D. marsupialis</i>	Parque del Este	S	♂	8	8	1,00	100
MDID/VE/1995/CO79*	<i>D. marsupialis</i>	Parque del Este	S	♀	8	18	1,00	100
MRAT/VE/2012/CO84**	<i>R. rattus</i>	Colinas de Bello Monte	PD	♂	13	46	15,57	67
MDID/VE/2009/CD123	<i>D. marsupialis</i>	La Escopeta	PD	♀	21	14	4,69	33
MDID/VE/2009/CD125	<i>D. marsupialis</i>	La Escopeta	S	♀	13	16	2,88	100
MDID/VE/2009/CD135	<i>D. marsupialis</i>	La Escopeta	PD	♂	18	26	1,92	0
MDID/VE/2012/CD136	<i>D. marsupialis</i>	Jabillal Abajo	S	♀	23	14	2,13	0
MDID/VE/2011/CD172	<i>D. marsupialis</i>	Jabillal Abajo	PD	♂	14	31	2,86	33

EC: ecótopo (PD: Peridoméstico, S: silvestre); SX: sexo (♂: macho; ♀: hembra); PP: Periodo prepatente; PIP: Periodo de infección patente; MP: máxima parasitemia; %M: porcentaje de mortalidad. *Aislados de referencia caracterizados anteriormente en el laboratorio de Biología de tripanosomatídeos-UCV; **Aislado de referencia del laboratorio re-evaluado en esta investigación.

Los valores promedio de **PP** para los aislados obtenidos de las especies de mamíferos, independientemente de la región geográfica, fueron *C. thous* (18 días), *D. marsupialis* (15 días), *R. rattus* (14 días), *D. rotundus* y *O. margaritae* (13 días), *E. asinus* (8 días) y *P. tajacu* (6 días).

La virulencia considerada como alta capacidad de multiplicación del parásito, medida en los valores máximos de parasitemia, para los aislados provenientes de mamíferos, independientemente de la región geográfica y discriminada por especie fue liderada por *D. rotundus* ($21,12 \times 10^4$ flag/ml de sangre), seguida de *C. thous* ($12,16 \times 10^4$ flag/ml de sangre), *E. asinus* ($10,45 \times 10^4$ flag/ml de sangre), *R. rattus* ($10,29 \times 10^4$ flag/ml de sangre), *O. margaritae* ($7,68 \times 10^4$ flag/ml de sangre), *D. marsupialis* ($5,90 \times 10^4$ flag/ml de sangre) y *P. tajacu* ($1,71 \times 10^4$ flag/ml de sangre).

En relación al **%M** los valores fueron similares para los aislados en ambas regiones, con un promedio de 69% ($\pm 39,7SD$), sin diferencias significativas ($p > 0,05$) (Anexos 3 y 4). Los aislados más patógenos correspondieron a los obtenidos de *D. rotundus*, *C. thous* y *O. margaritae* con 100% de mortalidad; los obtenidos de *D. marsupialis* y *R. rattus* con 67% y los de *P. tajacu* y *E. asinus* con 33% cada uno.

En cuanto a la sintomatología externa, para todos los casos a medida que avanzó el curso de la infección, los ratones manifestaron desorden en la marcha, urinación espontánea, pérdida de motilidad en miembros inferiores, hirsutismo, alopecia y distensión abdominal, reflejando externamente una apariencia de hepatoesplenomegalia.

Al comparar todos los parámetros de la cinética de infección de los aislados de mamíferos entre regiones geográficas mediante el análisis de *box plot*, se evidenció que el **PIP** mostró mayor amplitud en los valores para ambas regiones, indicando mayor variabilidad (Figura 14).

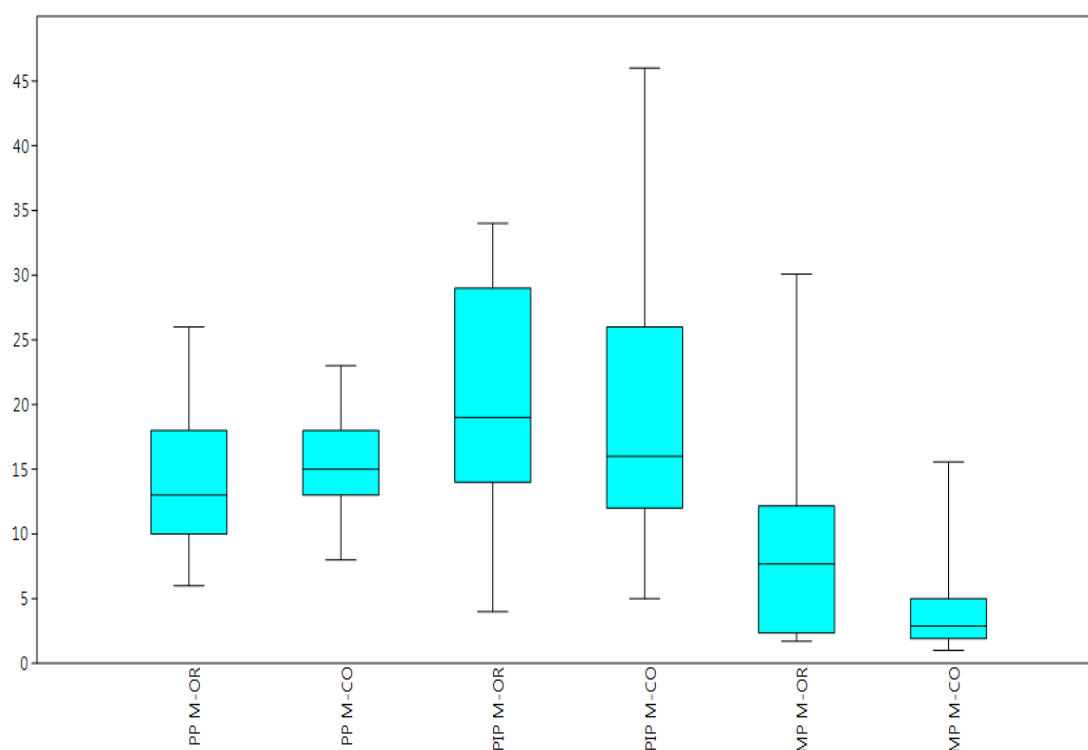


Figura 14. Evaluación de los parámetros de infección mediante diagrama de cajas (box plot) de los aislados de *Trypanosoma cruzi* obtenidos de mamíferos en las regiones Oriental y Centro-Occidental de Venezuela. PP: periodo prepatente; PIP: periodo de infección patente; MP: máxima parasitemia; M: Mamíferos; OR: región Oriental; CO: región Centro-Occidental. (PAST 3.12).

Generalizando los resultados antes expuestos, se observó heterogeneidad en los parámetros de la cinética de infección para los aislados de *T. cruzi* obtenidos de triatominos y mamíferos independientemente de la región geográfica, con los valores de máxima parasitemia lo estadísticamente variables ($p < 0,05$, F-test), siendo más elevados para los aislados de triatominos, en relación con los aislados de mamíferos (Figura 15).

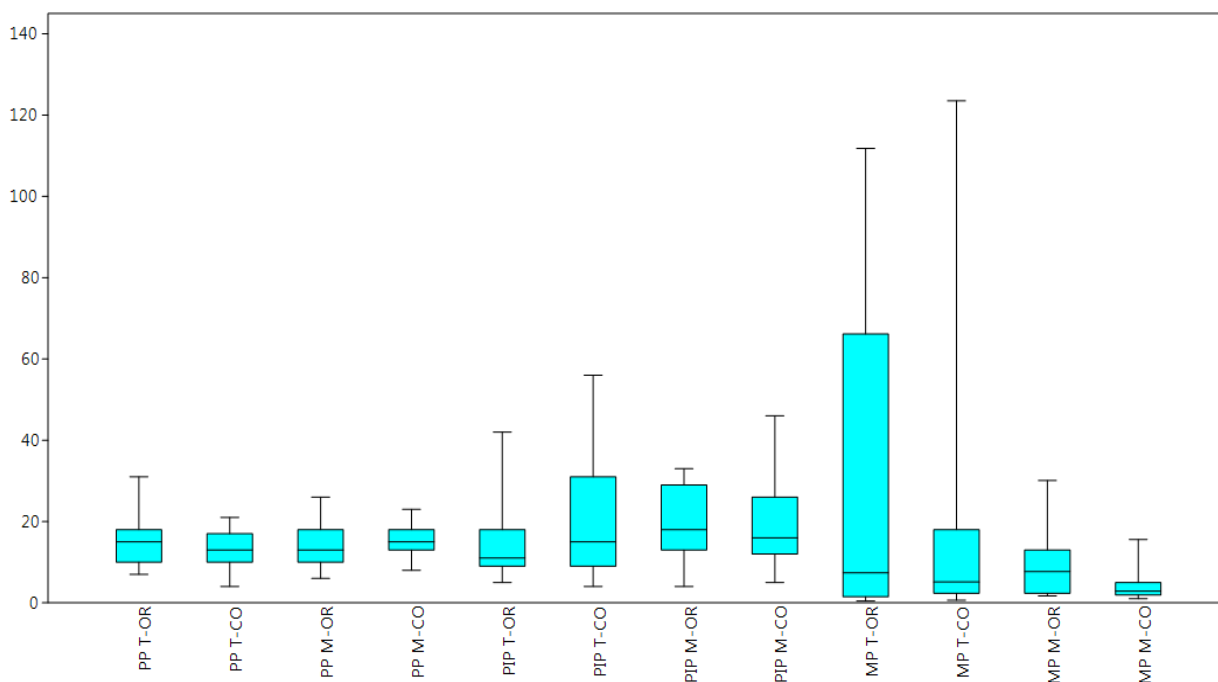


Figura 15. Evaluación comparativa de los parámetros de infección mediante diagrama de cajas (box plot) de los aislados de *Trypanosoma cruzi* obtenidos de triatomíneos y mamíferos en las regiones Oriental y Centro-Occidental de Venezuela. PP: periodo prepatente; PIP: periodo de infección patente; MP: máxima parasitemia; T: triatomíneos; M: mamíferos; OR: región Oriental; CO: región Centro-Occidental (PAST 3.12).

7.3. Parasitismo tisular.

El parasitismo tisular fue evaluado en el 64% de los aislados caracterizados parasitológicamente, 20 provenientes de la región Oriental (8 aislados de triatomíneos y 12 de mamíferos) y 19 aislados de la región Centro-Occidental (13 aislados de triatomíneos y 7 de mamíferos) evidenciándose paninfectividad, la cual se corroboró por la invasión en tejidos derivados del ectodermo (cerebro), mesodermo (músculo esquelético, corazón) y endodermo (hígado, páncreas, pulmón, riñones, intestino delgado, bazo) con diferente intensidad.

En mas detalle, los tejidos más parasitados fueron el muscular cardiaco (97%) y muscular esquelético (74%), seguidos en proporción por pulmón (36%), páncreas (33%), hígado e intestino delgado (31%), cerebro y riñón (23%) y bazo (8%).

La intensidad de la invasión parasitaria para cada tejido, discriminada por aislado, fuente de origen y región geográfica es descrita en la Tabla 8.

Tabla 8. Parasitismo tisular e intensidad de invasión causada por los aislados de *Trypanosoma cruzi* en ratones NMRI infectados experimentalmente.

TRIATOMINOS										
Región	Aislado	Órganos								
		Corazón	Musculo esquelético	Pulmón	Intestino delgado	Páncreas	Hígado	Riñón	Cerebro	Bazo
Oriental	TPRX/VE/2006/VP64*	++	+	-	+	-	-	+	-	+
	TMAC/VE/2012/VP150	++++	+++	-	-	-	+	-	-	-
	TGEN/VE/2012/VP151	++	++	-	ND	-	-	-	-	-
	TGEN/VE/2012/VP152	++	++	-	-	-	-	-	-	-
	TMAC/VE/2012/VP154	++	++	-	+	+	-	-	-	-
	TPIC/VE/2012/VP168	+	+	-	-	+	-	-	-	-
	TPART/VE/2012/VP169	+++	+++	+	-	+++	+	-	-	-
	TPRX/VE/2009/VP182	++	++	-	-	-	-	-	-	-
Centro-Occidental	TGEN/VE/2009/VP90	++	+	+	+	-	+	+	+	-
	TGEN/VE/2010/VP95	++	-	+	-	+	+	+	-	-
	TGEN/VE/2010/VP97	++	++	-	ND	-	-	-	-	-
	TGEN/VE/2010/VP98	++++	-	+	+	+	-	-	+	+
	TGEN/VE/2010/VP99	++++	++++	+	-	-	-	-	+	ND
	TGEN/VE/2010/VP100	++	++	+	-	+	+	+	ND	-
	TGEN/VE/2010/VP110	++	++	+	+	-	-	-	+	-
	TGEN/VE/2011/VP121	++++	++	+	+	-	-	+	+	-
	TGEN/VE/2010/VP122	++	++	+	+	+	ND	+	+	ND
	TPRX/VE/2010/VP148	++	-	-	+	-	+	+	+	+
	TGEN/VE/2012/VP155	+	+	+	-	-	-	-	ND	-
	TGEN/VE/2014/VP171	++	-	-	-	-	+	-	+	-

MAMIFEROS										
Región	Aislado	Órganos								
		Corazón	Musculo esquelético	Pulmón	Intestino delgado	Páncreas	Hígado	Riñón	Cerebro	Bazo
Oriental	MEAS/VE/2009/CD112	++	-	-	-	-	-	-	-	-
	MDID/VE/2012/CD113	++++	++++	+++	-	-	-	-	-	-
	MDID/VE/2009/CD118	++	-	ND	-	-	-	-	-	-
	MDID/VE/2009/CD120	++	-	ND	-	ND	-	-	-	-
	MDID/VE/2009/CD160	-	++	-	-	-	-	-	-	-
	MDID/VE/2012/CD162	++++	+++	-	-	+	+	+	-	-
	MDID/VE/2013/CD164	++++	+++	-	-	-	-	-	-	-
	MDID/VE/2013/CD165	++	+++	-	-	-	-	-	-	-
	MCTH/VE/2012/CD168	++	-	+	-	+	+	-	-	-
	MDES/VE/2012/CD170	+++	++	++	++	-	-	-	-	-
	MODM/VE/2012/CD171	++	-	-	-	-	+	-	+	-
	MPEC/VE/2012/CD173	+	+	-	-	-	+	-	-	-
Centro-Occidental	MDID/VE/1992/CO16*	++++	++++	-	+	+	+	-	-	-
	MRAT/VE/1993/CO22*	++	+++	+	+	+	-	+	-	-
	MRAT/VE/2012/CO84**	++++	+	-	-	-	-	-	-	-
	MDID/VE/2009/CD123	++	-	-	-	ND	-	-	-	-
	MDID/VE/2012/CD136	++	++	-	-	-	-	-	-	-

Grado de histotropismo N° Pseudoquistes/50 campos visual microscópico a 400X

- = Parasitismo ausente - = 0 (grado 0)
 + = Parasitismo escaso + = 1-10 (grado 1)
 ++ = Parasitismo moderado ++ = 10-30 (grado 2)
 +++ = Parasitismo abundante +++ = 30-60 (grado 3)
 ++++ = Parasitismo intenso ++++ = >60 (grado 4)

ND: no determinado * Aislado de laboratorio para comparación. ** Aislado de referencia del laboratorio.

Los resultados revelaron intenso cardiotropismo (invasión grado 4), abundantes pseudoquistes del parásito en los espacios entre las fibras musculares, con infiltrado inflamatorio y alteración de la arquitectura de las fibras cardíacas para los aislados VP150, CD113, CD162 y CD164 de la región Oriental y VP98, VP99, VP121, CO16, CO79 y CO84 de la región Centro-Occidental. Sin embargo, el aislado CD160 obtenido de un *D. marsupialis* en un ecótopo silvestre de la región Oriental, no evidenció invasión en corazón (Tabla 8; Figura 16).

El parasitismo hacia músculo esquelético fue variable en intensidad, mostrando desde escasos nidos de amastigotes dentro de la fibra muscular hasta abundantes pseudoquistes de amastigotes e infiltrados. Ejemplos de ello fueron observados en el aislado CD113 de la región Oriental y en el aislado VP99 de la región Centro-Occidental, resultados comparables a los encontrados en los aislados de referencia del laboratorio de biología de tripanosomatídeos, CO16 y CO79 con parasitismo intenso, provenientes también de la región Centro-Occidental (Tabla 8, Figura 16).

En el pulmón se observó invasión a nivel del estroma y en la musculatura lisa de los alveolos, siendo los aislados de la región Oriental CD170 (proveniente del murciélago *D. rotundus*) y CD113 (proveniente de *D. marsupialis*) los que presentaron parasitismo desde moderado a abundante respectivamente, en tanto los aislados VP169 (proveniente de *Ps. arthuri*) y CD168 (proveniente de *C. thous*) presentaron parasitismo escaso.

Los aislados de la región Centro-Occidental VP90, VP95, VP98, VP99, VP100, VP110, VP121, VP122, VP155 todos provenientes de *P. geniculatus*, presentaron escaso parasitismo tisular hacia el pulmón al igual que el aislado de referencia CO22, obtenido de *R. rattus* proveniente de la misma región Centro-Occidental, específicamente del Valle de Caracas (Figura 16).

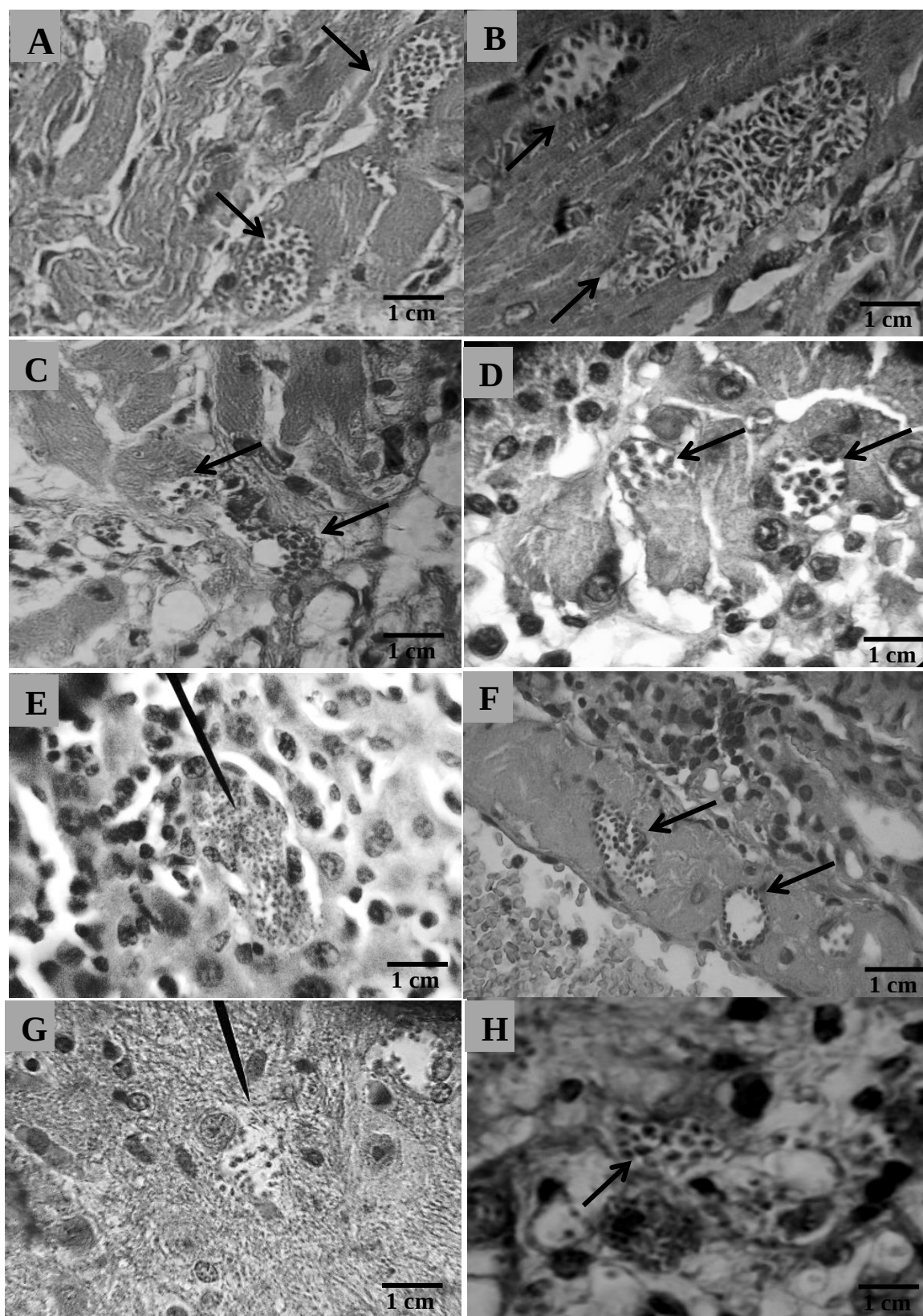


Figura 16. Microfotografías de secciones histológicas de ratones NMRI infectados experimentalmente con aislados de *Trypanosoma cruzi* obtenidos de triatomíneos y mamíferos en las regiones Oriental y Centro-Occidental de Venezuela. Tinción con hematoxilina-eosina y visualizados a 1000X. A) Tejido muscular cardíaco; B) Tejido muscular esquelético; C) Tejido muscular liso de Pulmón; D) Tejido pancreático; E) Tejido hepático; F) Tejido muscular liso de Intestino delgado; G) Corteza Cerebral; H) Nido en glándula suprarrenal. Las flechas indican la presencia de nidos; 1 cm: 15 μ m

En el páncreas se observó escasa invasión de los acinos pancreáticos y alteraciones de la arquitectura tisular, en 13 aislados de los cuales, 5 correspondieron a la región Oriental (VP168, VP169, VP154, CD162 y CD168) y los 8 restantes a la región Centro-occidental todos provenientes de triatomíneos de la especie *P. geniculatus* (VP29, VP95, VP98, VP100 y VP122). Los aislados de referencia de la misma región usados para comparación (CO16 y CO79) provenientes de *D. marsupialis* y CO22 de *R. rattus*, mostraron el mismo patrón de invasión pancreática. El aislado VP169 obtenido de *Ps. arthuri* de la región Oriental fue el único que mostró un parasitismo abundante (grado 3) (Tabla 8, Figura 16).

El hígado presentó pérdida de la arquitectura normal del tejido e infiltrado inflamatorio, con parasitismo escaso en 12 de los aislados evaluados, de los cuales 6 aislados eran de la región Oriental (VP150, VP169, CD162, CD168, CD171 y CD173) y los restantes de la región Centro-Occidental representado por los aislados VP90, VP95, VP100, VP148, VP171 y CO16, este último como aislado de referencia en el laboratorio (Tabla 8, Figura 16).

En el intestino delgado fueron evidenciados pocos nidos de amastigotes en 12/39 aislados, de los cuales 3 fueron de la región Oriental y los 9 restantes de la región Centro-Occidental, siendo el aislado CD170, obtenido de un murciélago en un ecótopo silvestre de la región oriental, el único que presentó parasitismo moderado en este tejido (Tabla 8).

El tropismo hacia el tejido nervioso fue escaso y se observó principalmente en aislados de la región Centro-Occidental, específicamente en los obtenidos de triatomíneos (VP90, VP98, VP99, VP110, VP121, VP122, VP148 y VP171), sin embargo, para la región Oriental un solo aislado presentó este tropismo y correspondió al aislado CD171 obtenido de un venado (*O. margaritae*). Ninguno de los aislados de referencia del laboratorio, presentaron invasión en este tejido (Tabla 8).

El histotropismo en el riñón fue escaso, observándose infiltrados celulares y pocos nidos; dos aislados en la región Oriental presentaron este tropismo (VP64 y CD162), mientras que en la región Centro-occidental siete aislados (VP90, VP95, VP100, VP121, VP122, VP148 y CO22) la mayoría provenientes presentaron este patrón de invasión (Tabla 8, Figura 16).

En el bazo fueron observados pequeños infiltrados con daño leve, el parasitismo fue escaso (grado1) y sólo se observó en tres aislados de triatomíneos, dos obtenidos de *R. prolixus* en ecótopos peridomésticos (VP64 y VP148) y uno de *P. geniculatus* de ecótopo doméstico (VP98; Tabla 8).

El parasitismo tisular de los aislados de referencia del laboratorio fue coincidente con los aislados provenientes de las mismas regiones, en cuanto a invasión en los tejidos muscular cardíaco y muscular esquelético con variación en los grados de histotropismo, independientemente de la fuente de inóculo, siendo el tejido cerebral el único que no presentó invasión en los aislados de referencia.

7.4. Análisis integrado del comportamiento biológico de los aislados de *Trypanosoma cruzi*

Los parámetros que se emplearon para estudiar el comportamiento biológico respecto a la cinética de infección (PP, PIP, MP, %M) y el parasitismo tisular de los aislados de *T. cruzi* obtenidos de triatomíneos (Tr) y mamíferos (Ma) en las regiones Oriental (O) y Centro-Occidental (CO) de Venezuela, fueron analizados mediante un análisis de componentes principales (ACP), realizando una matriz de covarianza en la cual se agruparon los elementos vectoriales generados de cada par de coordenadas mediante análisis canónico de todos los parámetros estudiados, en donde el primer componente principal (CP1) estuvo determinado principalmente por la Mortalidad (%M), seguido del CP2 asociado con parasitismo tisular y finalmente el CP3 estuvo determinado por una aproximación entre el parasitismo tisular (PT) y el periodo de infección patente (PIP) (Tabla 9).

Tabla 9. Valores de Covarianza para el análisis integrado de los parámetros del comportamiento biológico de los aislados de *Trypanosoma cruzi* obtenidos de triatomíneos y mamíferos en las regiones Oriental y Centro-Occidental de Venezuela.

	CP1 (Eje 1)	CP2 (Eje 2)	CP3 (Eje 3)	CP4 (Eje 4)	CP5 (Eje 5)
Autovalores	1,68	1,26	0,92	0,67	0,47
Porcentaje	33,63	25,21	18,36	13,38	9,43
Porcentaje Acumulado	33,63	58,83	77,19	90,57	100
Parámetros biológicos					
PP	-0,431	0,480	-0,517	-0,129	0,548
PIP	-0,393	-0,567	0,433	-0,137	0,563
MP	0,491	-0,310	-0,369	-0,712	0,412
%M	0,626	0,066	0,043	0,500	0,592
PT	0,160	0,590	0,639	-0,456	0,104

CP = Componente principal de variación; PP: período prepatente; PIP: periodo de infección patente; MP: máxima parasitemia; % M: mortalidad expresada en porcentaje; PT: parasitismo tisular. Los valores en negrita hacen referencia a los parámetros biológicos con mayor aporte en el análisis para cada componente.

El ACP evaluando los componentes CP1 y CP2, indicó una agrupación del 59% de la variabilidad del sistema, cuyo parámetro de importancia fue la mortalidad en el CP1, sin embargo, mediante la gráfica bidimensional de estos dos componentes no se evidenció discriminación de los grupos según los parámetros evaluados a pesar de que se resalta mayor heterogeneidad en los triatomíneos en contraste con los mamíferos (Figura 17-A), no obstante, mediante la gráfica tridimensional evaluando CP1, CP2 y CP3, los cuales agrupan el 77% de la variabilidad, fue posible establecer la segregación de los aislados, generándose una nube para los aislados provenientes de triatomíneos (Azul) y otra para los de mamíferos (roja) independientemente de la región geográfica (Figura 17-B).

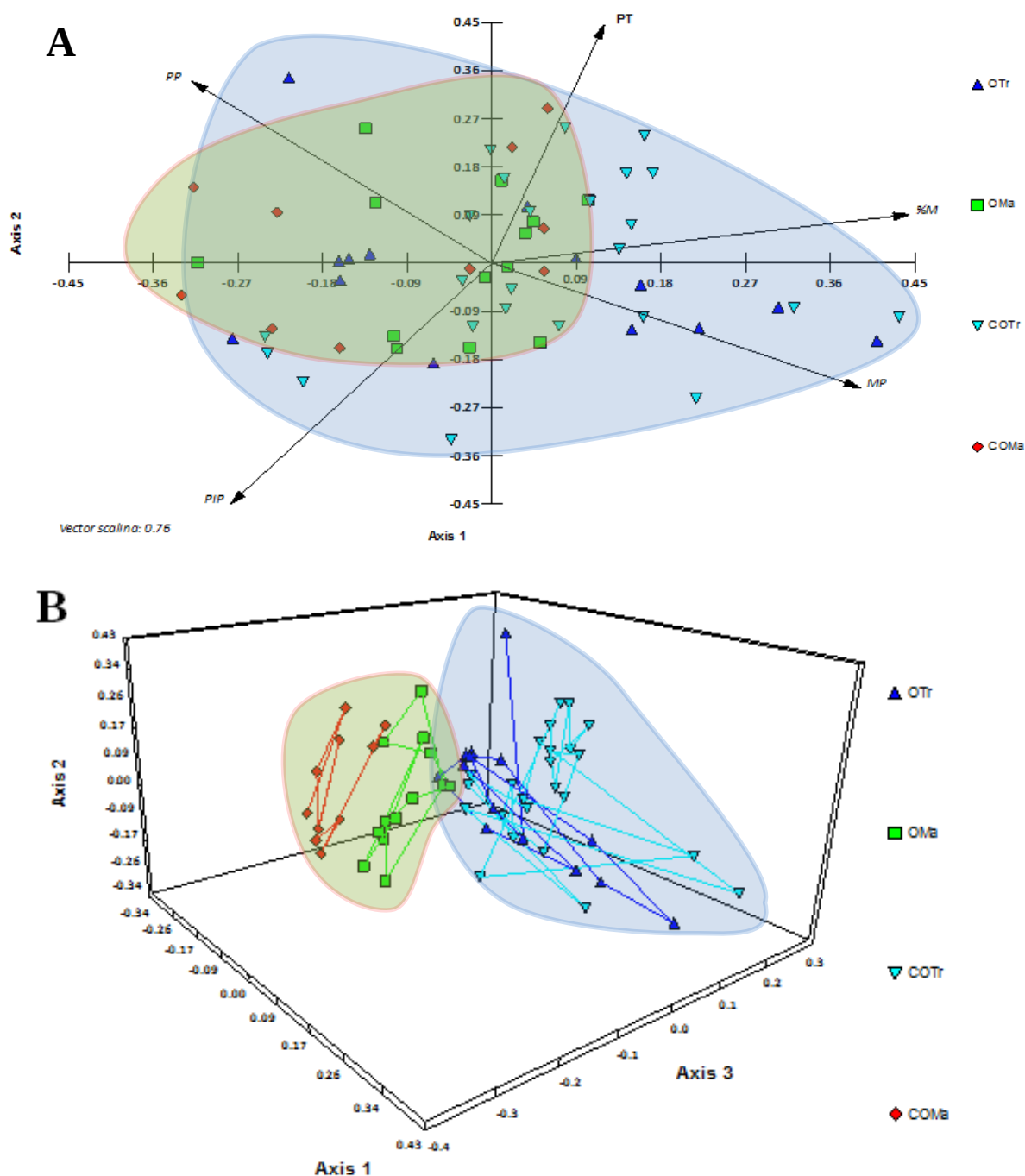


Figura 17. Analisis de componentes principales (ACP) integrando los parámetros del comportamiento biológico de los aislados de *Trypanosoma cruzi* provenientes de triatomino y mamíferos de Venezuela. A) Gráfica bidimensional CP1 y CP2. B) Gráfica tridimensional con CP1, CP2 y CP3. PP: periodo prepatente; PIP: periodo de infección patente; MP: máxima parasitemia; %M: porcentaje de mortalidad; PT: parasitismo tisular; OTr: Triatomino región Oriental; COTr: Triatomino región Centro-Occidental; OMa: Mamíferos región Oriental; COMa: Mamíferos región Centro-Occidental. Axis 1: Componente principal 1; Axis 2: Componente principal 2; Axis 3: Componente principal 3.

El análisis ACP variando la asociación entre CP1-CP3 y CP2-CP3, indicó una separación más evidente entre los aislados de triatomos y mamíferos independientemente de la región geográfica, confirmando que existe variabilidad entre los parámetros evaluados pero que los mismos no son estadísticamente significativos a pesar de observarse mayor dispersión en la data proveniente de los aislados de triatomos (Figura 18-A y B).

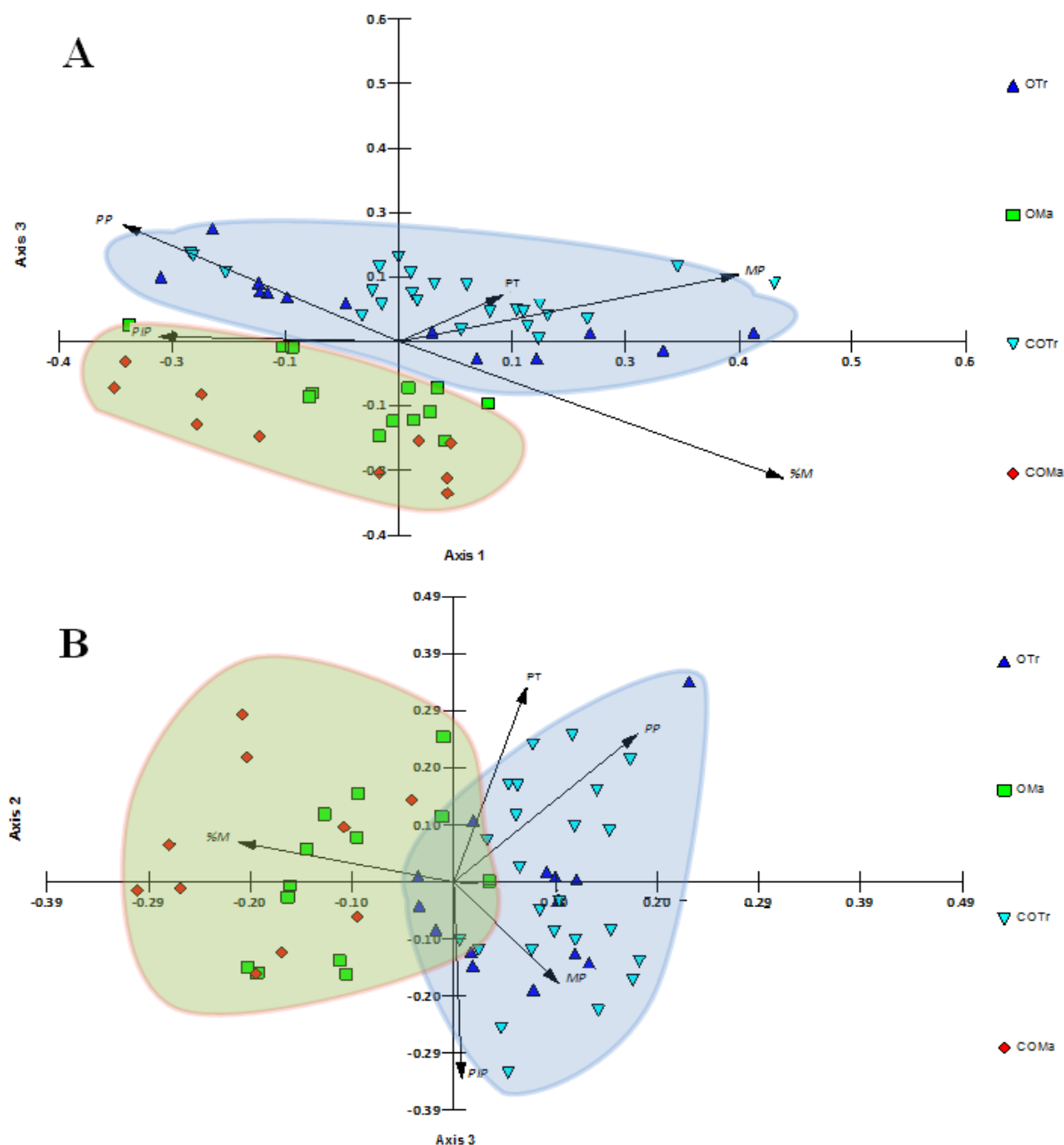


Figura 18. Análisis de componentes principales (ACP) evaluando los parámetros del comportamiento biológico de los aislados de *Trypanosoma cruzi* combinando CP1, CP2 y CP3. A) Gráfica bidimensional de CP1 y CP3. B) Gráfica bidimensional de CP2 y CP3. PP: periodo prepatente; PIP: periodo de infección patente; MP: máxima parasitemia; %M: porcentaje de mortalidad; Histotropismo: tropismo tisular; OTr: Triatomos región Oriental; COTr: Triatomos región Centro-Occidental; OMa: Mamíferos región Oriental; COMa: Mamíferos región Centro-Occidental. Axis 1: Componente principal 1; Axis 2: Componente principal 2; Axis 3: Componente principal 3.

Así mismo, mediante un análisis de conglomerados (UPGMA) se confirmó que existe una mayor similitud respecto al comportamiento biológico entre los grupos provenientes de los mismos hospedadores, siendo los aislados de mamíferos más similares entre sí que con los triatomíneos, independientemente de la región geográfica (Figura 19).

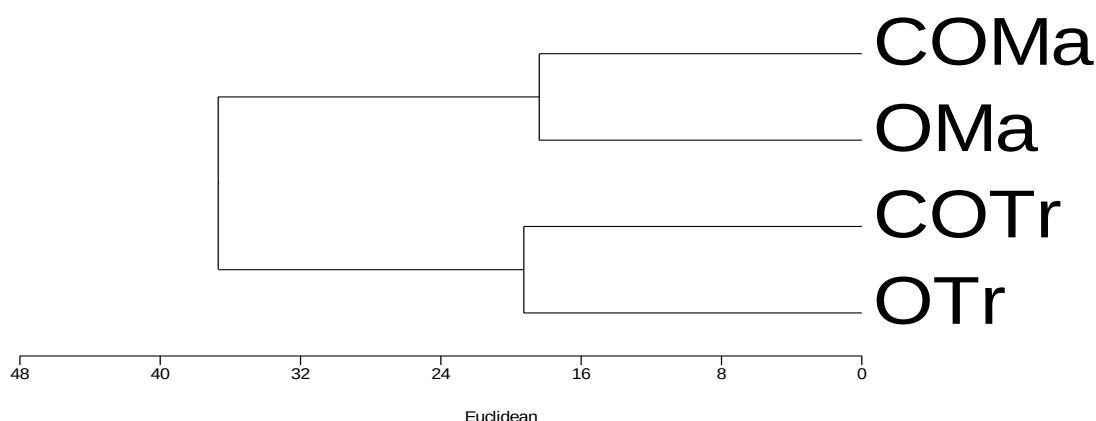


Figura 19. Análisis de conglomerado (UPGMA) de los parámetros del comportamiento biológico de los aislados de *Trypanosoma cruzi* en Venezuela. COMa: Mamíferos de Centro-Occidente; OMa: Mamíferos de Oriente; COTr: Triatomíneos de Centro-Occidente; OTr: triatomíneos de Oriente.

7.5. Caracterización genotípica de los aislados de *Trypanosoma cruzi* obtenidos de triatomíneos y mamíferos.

7.5.1. Extracción y cuantificación del ADN

El ADN extraído tanto del contenido intestinal de triatomíneos naturalmente infectados, como de triatomíneos de xenodiagnóstico sobre mamíferos y de cultivos de los 61 aislados del parásito caracterizados a nivel biológico, fue cuantificado mediante espectrofotometría y su integridad se evidenció mediante separación electroforética de bandas de tamaño característico del ADN genómico según la metodología (ver ítem 6.6.2; Figura 20).

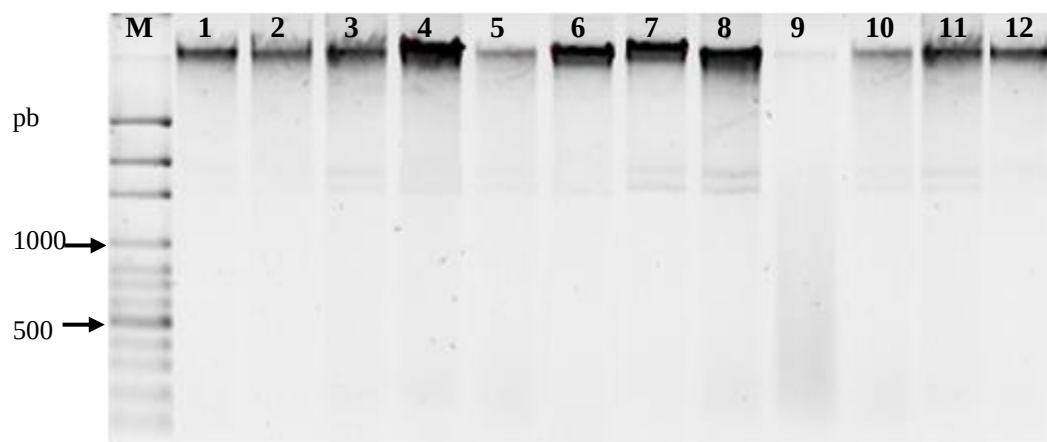


Figura 20. Gel de integridad del ADN genómico de los aislados de *Trypanosoma cruzi*. Electroforesis en gel de agarosa al 0,8% en TAE 1X, teñido con bromuro de etidio. La banda superior, mayor de 30 kb, representa el DNA genómico de *T. cruzi* obtenido de triatomíneos y mamíferos en las regiones Oriental y Centro-Occidental de Venezuela. (M) Marcador de tamaño molecular 1 kb (Promega). De izquierda a derecha (1-6) **Región Oriental**; (1-3) **Triatomíneos** (VP150, VP151, VP152); (4-6) **Mamíferos** (CD160, CD162, CD168); (7-12) **Región Centro-Occidental**: (7-9) **Triatomíneos** (VP100, VP129, VP148), (10-12) **Mamíferos** (CD123, CD136, CD172).

7.5.2. Diagnóstico molecular

La positividad para *T. cruzi* fue corroborada molecularmente mediante la amplificación del ADN del kinetoplasto (kDNA) observándose una banda de 330pb en 134/205 muestras provenientes de triatomíneos (65%) y en 87/255 muestras provenientes de mamíferos (34%), incluyendo los 61 aislados caracterizados biológicamente (23 de mamíferos y 38 de triatomíneos) mantenidos en medio de cultivos (Figura 21).

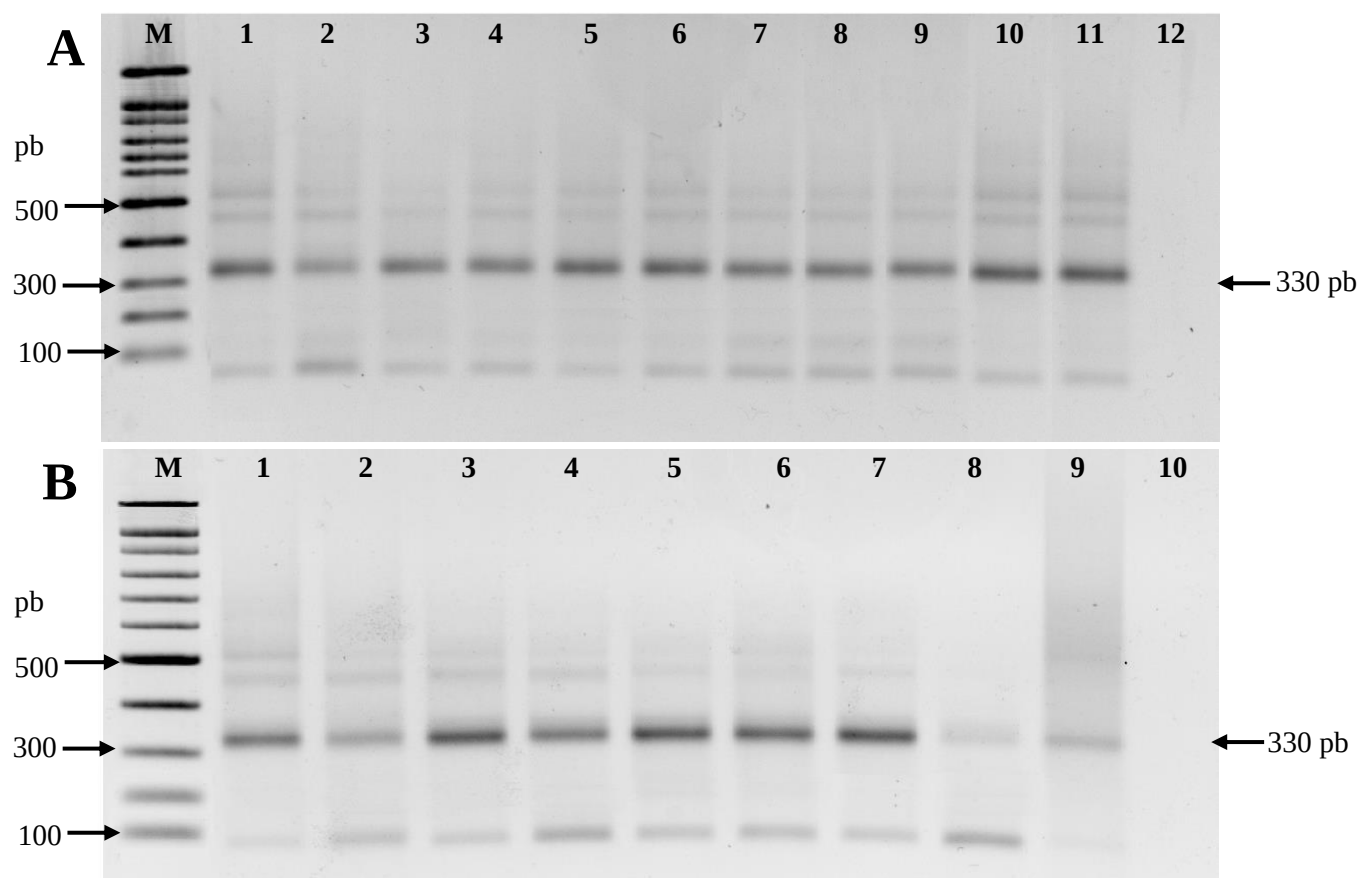


Figura 21. Amplificación del ADN del kinetoplasto (kDNA) de los aislados de *Trypanosoma cruzi* obtenidos de triatomíneos y mamíferos en las regiones Oriental y Centro-Occidental de Venezuela. Electroforesis en gel de agarosa al 1% en TAE, teñido con bromuro de etidio, se observa una banda de 330 pb producto de amplificación por PCR del DNA de kinetoplasto de *T. cruzi* (Britto y col., 1993; Wincker y col., 1994). **(A) Triatomíneos:** (M) Marcador de tamaño molecular 100 pb (Promega); (1) Control positivo (Cepa EP*); (2-6) **Región Oriental:** VP150, VP151, VP152, VP154, VP169; (7-11) **Región Centro-Occidental:** VP100, VP129, VP148, VP171, VP176; (12) Control negativo. **(B) Mamíferos:** (M) Marcador de tamaño molecular 100 pb (Promega); (1) Control positivo (Cepa EP*); (2-5) **Región Oriental:** CD160, CD162, CD168; CD170; (6-9) **Región Centro-Occidental:** CD123, CD135, CD136, CD172. (10) Control negativo. *Cepa Elpidio Padrón, aislada de un paciente en fase aguda de la Enfermedad de Chagas.

7.5.3. Estudio de la variabilidad genética.

Para establecer la presencia de posibles haplotipos del parásito circulantes en los 61 aislados de *T. cruzi* caracterizados biológicamente, fueron empelados diferentes marcadores moleculares de variabilidad genética, cuyos resultados se describen a continuación:

7.5.3.1. Amplificación del espaciador no transcrito del gen del mini-exón:

En la región Oriental de Venezuela el 71,43% (10/14) de los aislados del parásito provenientes de triatominos, amplificaron para una banda de 200 pb correspondiente al patrón del haplotipo TcI; el 21,43% (3/14) amplificó una banda de 150 pb asociado con el haplotipo TcIII y el 7,14% (1/14) amplificó para dos bandas, una de 200 pb y otra de 150 pb asociadas con el haplotipo TcI y TcIII respectivamente, indicando una infección mixta (Tabla 10;Figura 22-A).

En la región Centro-Occidental, el 95,83% (23/24) de los aislados provenientes de triatominos amplificaron para una banda de 200 pb, asociada con el patrón del haplotipo TcI y el 4,17% (1/24) restante, amplificó para dos bandas una de 200 pb y otra de 250 pb asociadas con los haplotipos TcI y TcIV respectivamente, indicando una infección mixta (Tabla 10; Figura 22-A).

Los aislados provenientes de mamíferos no presentaron variabilidad en los haplotipos del parásito con este marcador molecular, ya que el 100% de las muestras de la región Oriental y la Centro-Occidental, revelaron una banda de 200 pb, la cual está asociada con el haplotipo TcI (Tabla 11; Figura 22-B).

Tabla 10. Caracterización genotípica de los aislados de *Trypanosoma cruzi* circulantes en triatomíneos de las regiones Oriental y Centro- Occidental de Venezuela.

Aislado	Marcador Molecular/Tamaño molecular de bandas (pb)				Haplotipo/DTU
	kDNA ⁽¹⁾	ME ⁽²⁾	24S ⁽³⁾	18S ⁽³⁾	
REGION ORIENTAL					
TPRX/VE/2006/VP64*	330	200	110	175	TCI
TPRX/VE/2007/VP78*	330	200	110	175	TCI
TPRX/VE/2009/VP81	330	200	110	175	TCI
TCUS/VE/2012/VP145	330	200	110	175	TCI
TPRX /VE/2012/VP150	330	200	110	175	TCI
TGEN/VE/2012/VP151	330	150	110	165	TCIII
TGEN/VE/2012/VP152	330	150	110	165	TCIII
TMAC/VE/2012/VP154	330	150+200	110	165+175	TCIII+TCI=TCV
TMAC/VE/2012/VP158	330	200	110	175	TCI
TPRX/VE/2009/VP159	330	200	110	175	TCI
TGEN/VE/2011/VP164	330	200	110	175	TCI
TPIC/VE/2012/VP168	330	200	110	175	TCI
TART/VE/2012/VP169	330	150	110	165	TCIII
TPRX/VE/2009/VP182	330	200	110	175	TCI
REGIÓN CENTRO-OCCIDENTAL					
TGEN/VE/1996/VP29*	330	200	110	175	TCI
TGEN/VE/1997/VP31*	330	200	110	175	TCI
TGEN/VE/2009/VP80	330	200	110	175	TCI
TGEN/VE/2009/VP82	330	200	110	175	TCI
TGEN/VE/2009/VP85	330	200	110	175	TCI
TGEN/VE/2009/VP86	330	200	110	175	TCI
TGEN/VE/2009/VP87	330	200	110	175	TCI
TGEN/VE/2009/VP90	330	200	110	175	TCI
TGEN/VE/2010/VP95	330	200	110	175	TCI
TGEN/VE/2010/VP97	330	200	110	175	TCI
TGEN/VE/2010/VP98	330	200	110	175	TCI
TGEN/VE/2010/VP99	330	200	110	175	TCI
TGEN/VE/2010/VP100	330	200	110	175	TCI
TGEN/VE/2010/VP110	330	200	110	175	TCI
TGEN/VE/2011/VP121	330	200	110	175	TCI
TGEN/VE/2010/VP122	330	200	110	175	TCI
TPRX/VE/2010/VP129	330	200	110	175	TCI
TGEN/VE/2010/VP134	330	200	110	175	TCI
TGEN/VE/2012/VP146	330	200	110	175	TCI
TPRX/VE/2010/VP148	330	200+250	110+125	175+155	TCI+TCIV= TCV
TGEN/VE/2012/VP155	330	200	110	175	TCI
TGEN/VE/2014/VP171	330	200	110	175	TCI
TGEN/VE/2014/VP176	330	200	110	175	TCI
TGEN/VE/2014/VP186	330	200	110	175	TCI

kDNA: ADN del kinetoplasto; (1): Britto y col, 1993; Winker y col, 19994; ME: Mini-exón; (2) Fernández y col, 2001; 24Sα y 18S: regiones ribosomales; (3) Souto y col., 1996; Brisse y col., 2001. * Aislado de laboratorio para comparación. ** Aislado de referencia re-evaluado.

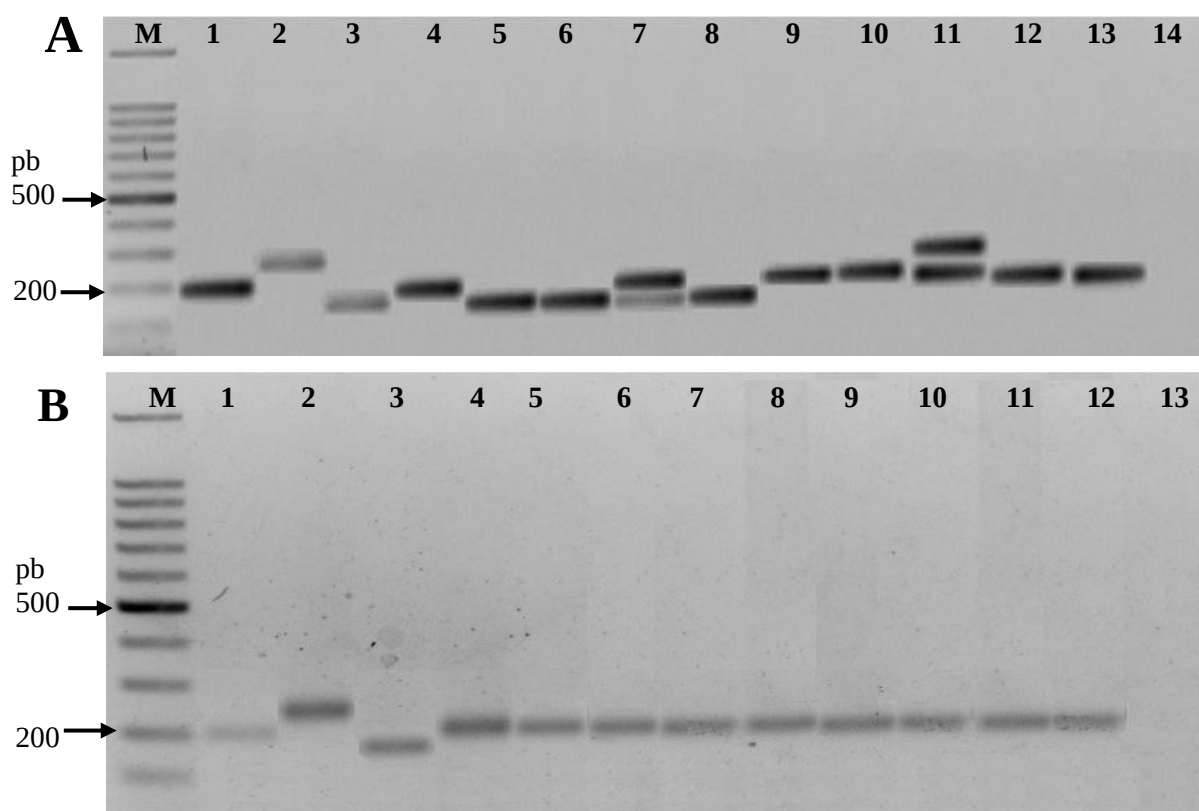


Figura 22. Amplificación del espaciador no transcrito del gen del mini-exón de los aislados de *Trypanosoma cruzi* obtenidos de triatomíneos y mamíferos en las regiones Oriental y Centro-Occidental de Venezuela. Electroforesis en gel de Agarosa al 2% en TAE 1X teñido con bromuro de etidio, se observaron bandas de 200pb (TcI), 250pb (TcIV) y 150pb (TcIII) producto de amplificación por PCR del gen mini-exón de *T. cruzi* (Fernandes y col., 2001). **(A) Triatomíneos:** (M) Marcador de tamaño molecular 100 pb (Promega); (1) Control positivo (TcI)*; (2) Control positivo (TcIV)**; (3) Control positivo (TcIII)***; (4-8) **Región Oriental:** VP150 (TcI), VP151 (TcIII), VP152 (TcIII), VP169 (TcIII), VP154 (TcI+TcIII); (9-13) **Región Centro-occidental:** VP100 (TcI), VP129 (TcI), VP148 (TcI+TcIV), VP171 (TcI), VP176 (TcI); (14) Control negativo. **(B) Mamíferos:** (M) Marcador de tamaño molecular 100 pb (Promega); (1) Control positivo (TcI)*; (2) Control positivo (TcIV)**; (3) Control positivo (TcIII)***; (4-8) **Región Oriental:** CD160 (TcI), CD162 (TcI), CD168 (TcI), CD170 (TcI); CD171 (TcI); (9-12) **Región Centro-Occidental:** CD123, CD135, CD136, CD172. (13) Control negativo. *Cepa Elpidio Padrón, aislada de un paciente en fase aguda de la enfermedad de Chagas. **Cepa MA286XC, aislado de *Dasypus novemcinctus* en Paraguay. *** Cepa Cachi1, aislado de *Dasypus novemcinctus* del estado Anzoátegui-Venezuela.

Tabla 11. Caracterización genotípica de los aislados de *Trypanosoma cruzi* circulantes en mamíferos de las regiones Oriental y Centro-Occidental de Venezuela.

Aislado	Marcador Molecular/Tamaño molecular de bandas (pb)				Haplotipo/DTU
	kDNA ⁽¹⁾	ME ⁽²⁾	24S ⁽³⁾	18S ⁽³⁾	
REGION ORIENTAL					
MEAS/VE/2009/CD112	330	200	110	175	TCI
MDID/VE/2012/CD113	330	200	110	175	TCI
MDID/VE/2009/CD116	330	200	110	175	TCI
MDID/VE/2009/CD118	330	200	110	175	TCI
MDID/VE/2009/CD120	330	200	110	175	TCI
MDID/VE/2009/CD160	330	200	110	175	TCI
MDID/VE/2012/CD162	330	200	110	175	TCI
MDID/VE/2013/CD164	330	200	110	175	TCI
MDID/VE/2013/CD165	330	200	110	175	TCI
MCTH/VE/2012/CD168	330	200	110	175	TCI
MDES/VE/2012/CD170	330	200	110	175	TCI
MODM/VE/2012/CD171	330	200	110	175	TCI
MPEC/VE/2012/CD173	330	200	110	175	TCI
REGION CENTRO-OCCIDENTAL					
MDID/VE/1992/CO16*	330	200	110	175	TCI
MRAT/VE/1993/CO22*	330	200	110	175	TCI
MDID/VE/1995/CO75*	330	200	110	175	TCI
MDID/VE/1995/CO79*	330	200	110	175	TCI
MRAT/VE/2012/CO84**	330	200	110	175	TCI
MDID/VE/2009/CD123	330	200	110	175	TCI
MDID/VE/2009/CD125	330	200	110	175	TCI
MDID/VE/2009/CD135	330	200	110	175	TCI
MDID/VE/2012/CD136	330	200	110	175	TCI
MDID/VE/2011/CD172	330	200	110	175	TCI

kDNA: ADN del kinetoplasto; (1): Britto y col, 1993; Winker y col, 19994; ME: Mini-exón; (2) Fernández y col, 2001; 24Sα y 18S: regiones ribosomales; (3) Souto y col., 1996; Brisse y col., 2001; * Aislado de laboratorio para comparación. ** Aislado de referencia re-evaluado.

7.5.3.2. Amplificación de las regiones codificantes para la subunidad grande (24Sα rDNA) del ADN ribosomal:

En la región Oriental no fue posible establecer variabilidad en los haplotipos del parásito mediante este marcador para los aislados provenientes de triatomíneos, debido a que estos únicamente amplificaron una banda de 110 pb que podría corresponder a los haplotipos TcI ó TcIII sin discriminación (Tabla 10; Figura 23-A).

En los aislados de triatomíneos para la región Centro-Occidental, el 4% (1/24) de las muestras presentó variabilidad con este marcador, observándose una banda de 110 pb y otra de 125 pb, las cuales están asociadas con los haplotipos TcI y TcIV respectivamente,

correspondiendo a una infección mixta. El 96% (23/24) restante, amplificó una banda de 110 pb asociada con el haplotipo TcI (Tabla 10; Figura 23-A).

Los aislados provenientes de mamíferos de ambas regiones geográficas, en un 100% fueron homogéneos en el patrón de amplificación de los haplotipos, encontrándose sólo la presencia de una banda de 110 pb asociada con TcI (Tabla 11; Figura 23-B).

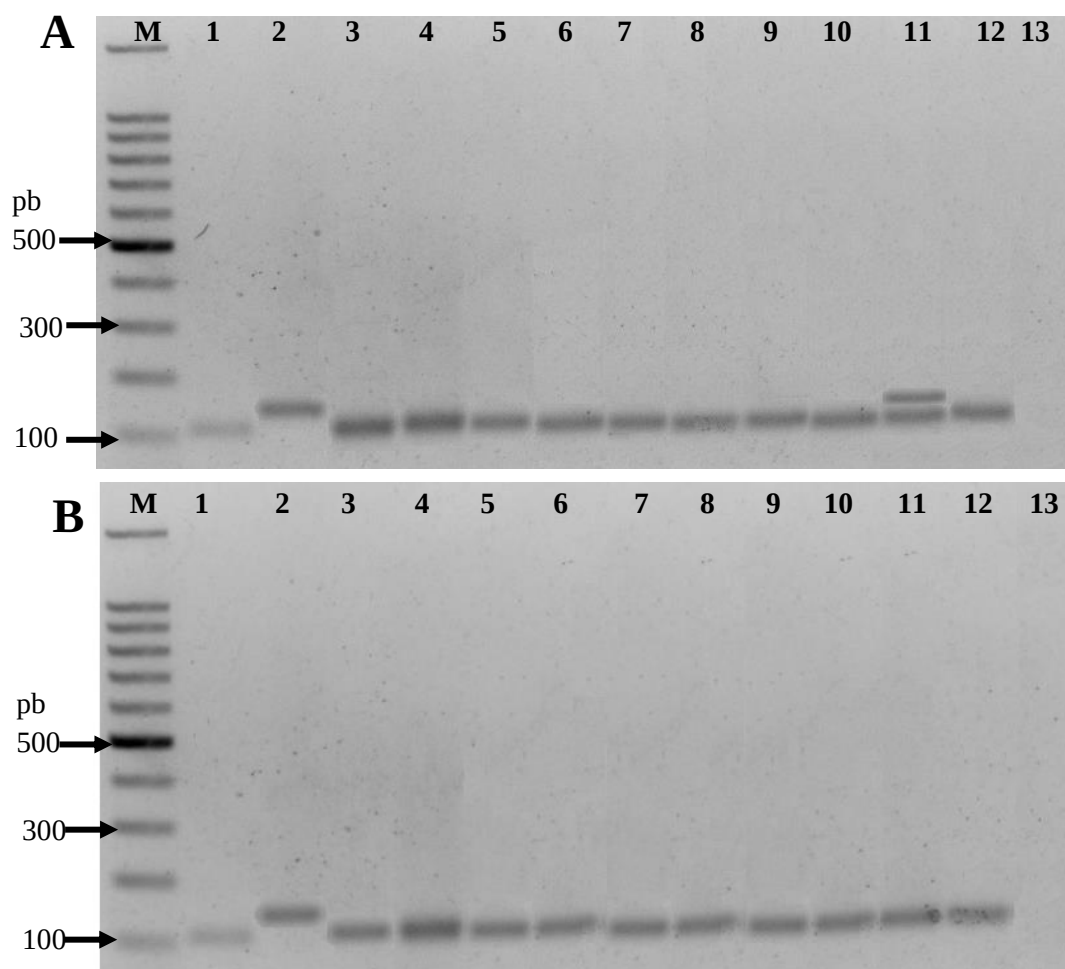


Figura 23. Amplificación de la subunidad 24Sα del ADN ribosomal en los aislados de *Trypanosoma cruzi* obtenidos de triatomíneos y mamíferos en las regiones Oriental y Centro-Occidental de Venezuela. Electroforesis en gel de Agarosa al 2% en TAE 1X teñido con bromuro de etidio. Productos de amplificación de la PCR para la detección de ADN de la subunidad 24Sα del ribosoma de *T. cruzi*, banda de 110 pb (TcI/TcIII) y 125 pb (TcIV) (Souto y col., 1996; Brisse y col., 2001). **(A). Triatomíneos:** (M) Marcador de tamaño molecular 100 pb (Promega); (1) Control positivo (TcI)*; (2) Control positivo (TcIV)**; (3) Control positivo (TcIII)***; (4-8) **Región Oriental:** VP150 (TcI/TcIII), VP151 (TcI/TcIII), VP152 (TcI/TcIII), VP169 (TcI/TcIII), VP154 (TcI/TcIII); (9-12) **Región Centro-occidental:** VP100 (TcI/TcIII), VP129 (TcI/TcIII), VP148 (TcI+TcIV), VP171 (TcI/TcIII); (13) Control negativo. **(B) Mamíferos:** (M) Marcador de tamaño molecular 100 pb (Promega); (1) Control positivo (TcI)*; (2) Control positivo (TcIV)**; (3) Control positivo (TcIII)***; (4-8) **Región Oriental:** CD160 (TcI/TcIII), CD162 (TcI/TcIII), CD168 (TcI/TcIII), CD170 (TcI/TcIII), CD171 (TcI/TcIII); (9-12) **Región Centro-Occidental:** CD123 (TcI/TcIII), CD135 (TcI/TcIII), CD136 (TcI/TcIII), CD172 (TcI/TcIII); (13) Control negativo. *Cepa Elpidio Padrón, aislado de un paciente en fase aguda de la enfermedad de Chagas. **Cepa MA286XC, aislado de *Dasyus novemcintus* en Paraguay. ***Cepa Cachi1, aislado de *Dasyus novemcintus* del estado Anzoátegui-Venezuela.

7.5.3.3. Amplificación de las regiones codificantes para la subunidad pequeña (18S rDNA) del ADN ribosomal:

Los aislados provenientes de triatomíneos en la región Oriental para este marcador reportaron la presencia de 2 haplotipos de *T. cruzi*, el primero correspondiente a TcI en donde el 72% (10/14) de los aislados amplificó una banda de 175 pb y el segundo haplotipo encontrado fue TcIII con una banda de 165 pb observada en el 21% (3/14) de los aislados; adicionalmente el 7% (1/14) restante amplificó para los dos patrones TcI+TcIII (Tabla 10; Figura 24-A).

En la región Centro-Occidental un 96% (23/24) de los aislados de triatomíneos amplificaron para el haplotipo TcI observándose una banda de 175 pb, y el 4% (1/24) restante amplificó para los haplotipos TcI (175 pb) y TcIV (155 pb), coincidiendo con los resultados obtenidos para el gen de mini-exón y el 24S α , donde se indicó infección mixta (Tabla 10; Figura 24-A).

Tanto en la región Oriental como en la Centro-Occidental los aislados provenientes de mamíferos no presentaron variabilidad en los haplotipos del parásito, puesto que todos amplificaron una banda de 175 pb asociada con el haplotipo TcI (Tabla 11; Figura 24-B).

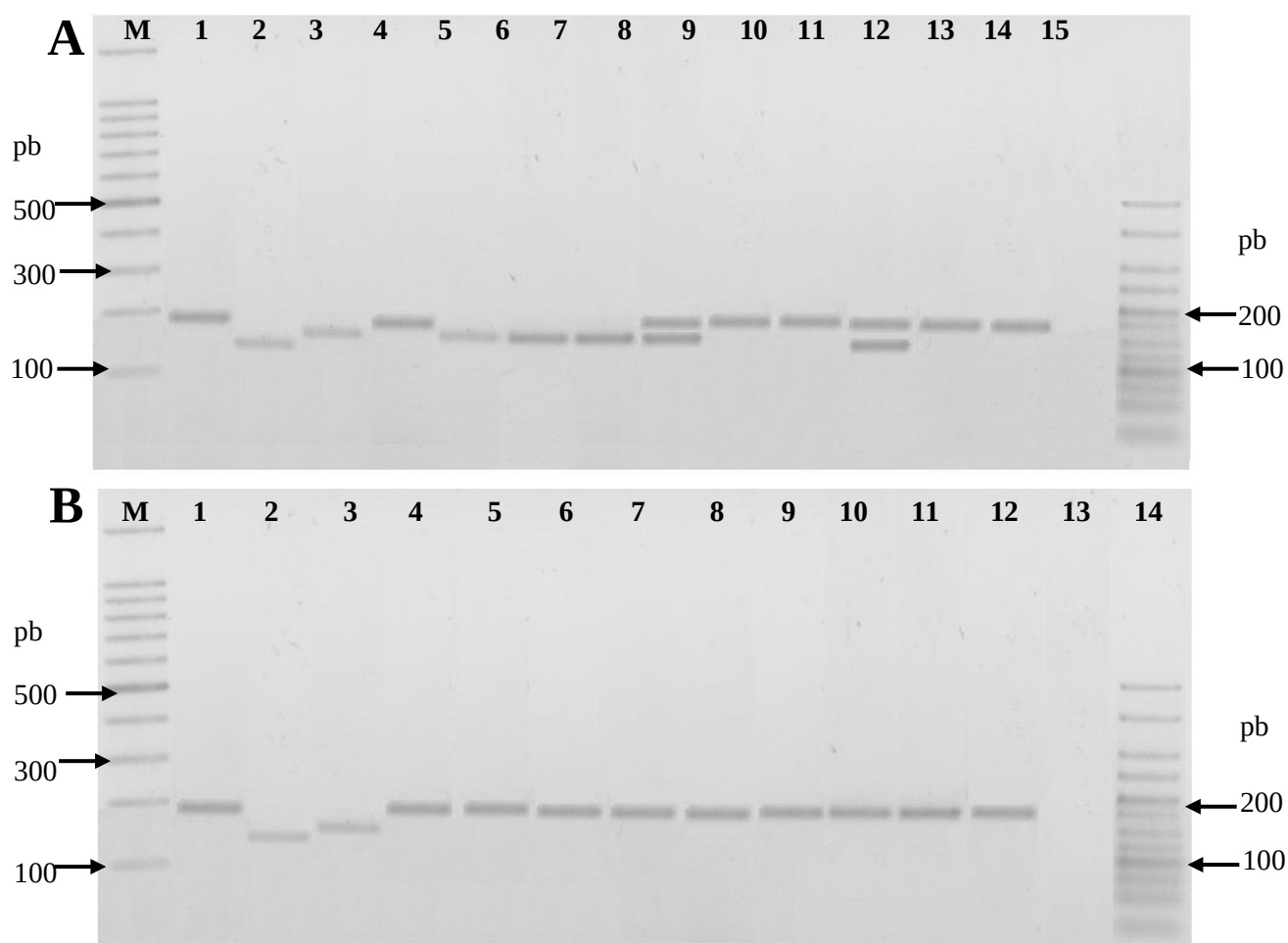


Figura 24. Amplificación de la subunidad 18S del ADN ribosomal de los aislados de *Trypanosoma cruzi* obtenidos de triatomíneos y mamíferos en las regiones Oriental y Centro-Occidental de Venezuela. Electroforesis en gel de Agarosa al 2% en TAE 1X teñido con bromuro de etidio. Productos de amplificación de la PCR para la detección de ADN de la subunidad 18S del ribosoma de *T. cruzi*, bandas de 175 pb (TcI), 165 pb (TcIII) y 155 pb (TcIV) (Souto y col., 1996; Brisse y col., 2001). **(A). Triatomíneos:** (M) Marcador de tamaño molecular 100 pb (Promega); (1) Control positivo (TcI)*; (2) Control positivo (TcIV)**; (3) Control positivo (TcIII)***; (4-8) **Región Oriental:** Triatomíneos: VP150 (TcI), VP151 (TcIII), VP152 (TcIII), VP169 (TcIII), VP154 (TcI+TcIII); (9-13) **Región Centro-Occidental:** VP100 (TcI), VP129 (TcI), VP148 (TcI+TcIV), VP171 (TcI), VP176 (TcI); (14) Control negativo; (15) Marcador de tamaño molecular Hyperladder V (Novagen). **(B) Mamíferos:** (M) Marcador de tamaño molecular 100 pb (Promega); (1) Control positivo (TcI)*; (2) Control positivo (TcIV)**; (3) Control positivo (TcIII)***; (4-8) **Región Oriental:** CD160 (TcI), CD162 (TcI), CD168 (TcI), CD170 (TcI), CD171 (TcI); (9-12) **Región Centro-Occidental:** CD123 (TcI), CD135; CD136 (TcI), CD172 (TcI); (13) Control negativo; (14) Marcador de tamaño molecular Hyperladder V (Novagen). *Cepa Elpidio Padrón, aislado de un paciente en fase aguda de la enfermedad de Chagas. **Cepa MA286XC, aislado de *Dasypus novemcinctus* en Paraguay. ***Cepa Cachi1, aislado de *Dasypus novemcinctus* del estado Anzoátegui-Venezuela.

7.5.3.4. Análisis de los polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción (RFLPs)

Los aislados de *T. cruzi* provenientes de triatominos y mamíferos de las regiones Oriental y Centro-Occidental de Venezuela, genéticamente variables cuando se estudiaron los marcadores moleculares ME, 24S α y 18S, fueron analizados por PCR-RFLPs para corroborar dicha variabilidad mediante la amplificación de los genes GPI, HSP60 e H1 con sus enzimas de restricción *HhaI*, *EcoRV* y *AatII* respectivamente, como se describe a continuación:

A. Aislados de Triatominos

Los aislados de *T. cruzi* obtenidos de triatominos en la región Oriental fueron heterogéneos respecto a los haplotipos del parásito circulante, observándose que el 72% (10/14) de los aislados amplificó para el haplotipo TcI, seguido del 21% (3/14) para el haplotipo TcIII, de los cuales dos aislados fueron obtenidos de *P. geniculatus* y el tercero de *Ps. arthuri*; el 7% (1/14) restante mostró una infección mixta con la presencia de los haplotipos TcI y TcIII, aislado obtenido de *T. maculata* (Tabla 12; Figura 25).

Respecto a los aislados de la región Centro-Occidental, se observó que el 96% (23/24) amplificó para el haplotipo TcI y el 4% (1/24) reveló una infección mixta con la presencia de los haplotipos TcI y TcIV (Tabla 12; Figura 25).

En general, los resultados obtenidos con los análisis de RFLPs para los haplotipos del parásito circulantes en diferentes especies de triatominos en Venezuela, coinciden con lo observado anteriormente mediante los marcadores ME, 24S α y 18S.

Tabla 12. Haplotipos de *Trypanosoma cruzi* circulantes en triatomíneos de las regiones Oriental y Centro-Occidental de Venezuela, establecidos mediante ensayos de PCR-RFLP.

Aislado	Marcador Molecular/ Tamaño molecular de bandas (pb)			Haplotipo/DTU
	HSP60(EcoRV)	GPI(HhaI)	H1(AatII)	
REGION ORIENTAL				
TPRX/VE/2006/VP64*	462	817+447	364+122	TCI
TPRX/VE/2007/VP78*	462	817+447	364+122	TCI
TPRX/VE/2009/VP81	462	817+447	364+122	TCI
TCUS/VE/2012/VP145	462	817+447	364+122	TCI
TPRX /VE/2012/VP150	462	817+447	364+122	TCI
TGEN/VE/2012/VP151	314+148	817+447	364+122	TCIII
TGEN/VE/2012/VP152	314+148	817+447	364+122	TCIII
TMAC/VE/2012/VP154	462+314+148	817+447	364+122	TCIII+TCI=TCV
TMAC/VE/2012/VP158	462	817+447	364+122	TCI
TPRX/VE/2009/VP159	462	817+447	364+122	TCI
TGEN/VE/2011/VP164	462	817+447	364+122	TCI
TPIC/VE/2012/VP168	462	817+447	364+122	TCI
TART/VE/2012/VP169	314+148	817+447	364+122	TCIII
TPRX/VE/2009/VP182	462	817+447	364+122	TCI
REGION CENTRO-OCCIDENTAL				
TGEN/VE/1996/VP29*	462	817+447	364+122	TCI
TGEN/VE/1997/VP31*	462	817+447	364+122	TCI
TGEN/VE/2009/VP80	462	817+447	364+122	TCI
TGEN/VE/2009/VP82	462	817+447	364+122	TCI
TGEN/VE/2009/VP85	462	817+447	364+122	TCI
TGEN/VE/2009/VP86	462	817+447	364+122	TCI
TGEN/VE/2009/VP87	462	817+447	364+122	TCI
TGEN/VE/2009/VP90	462	817+447	364+122	TCI
TGEN/VE/2010/VP95	462	817+447	364+122	TCI
TGEN/VE/2010/VP97	462	817+447	364+122	TCI
TGEN/VE/2010/VP98	462	817+447	364+122	TCI
TGEN/VE/2010/VP99	462	817+447	364+122	TCI
TGEN/VE/2010/VP100	462	817+447	364+122	TCI
TGEN/VE/2010/VP110	462	817+447	364+122	TCI
TGEN/VE/2011/VP121	462	817+447	364+122	TCI
TGEN/VE/2010/VP122	462	817+447	364+122	TCI
TPRX/VE/2010/VP129	462	817+447	364+122	TCI
TGEN/VE/2010/VP134	462	817+447	364+122	TCI
TGEN/VE/2012/VP146	462	817+447	364+122	TCI
TPRX/VE/2010/VP148	462	817+490+447+253	486+364+122	TCI+TCIV= TCV
TGEN/VE/2012/VP155	462	817+447	364+122	TCI
TGEN/VE/2014/VP171	462	817+447	364+122	TCI
TGEN/VE/2014/VP176	462	817+447	364+122	TCI
TGEN/VE/2014/VP186	462	817+447	364+122	TCI

HSP60: Proteína de choque térmico; GPI: proteína de superficie; H1: Proteína nuclear; EcoRV, HhaI, AatII: enzimas de restricción. Lewis y col, 2009.* Aislado de laboratorio para comparación. ** Aislado de referencia del laboratorio.

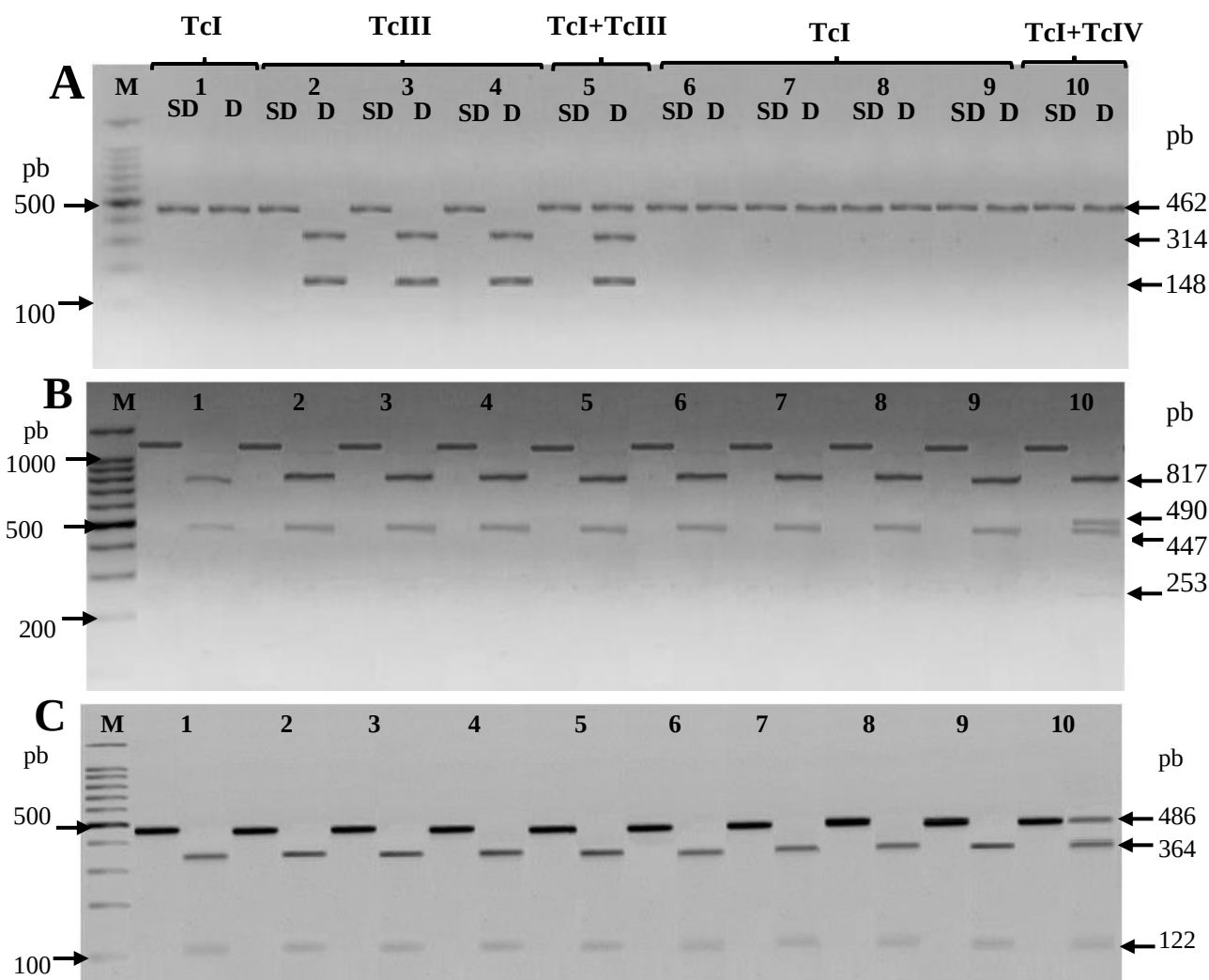


Figura 25. Perfiles de los haplotipos obtenidos mediante el análisis de los polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción (PCR-RFLPs) de los aislados de *Trypanosoma cruzi* provenientes de triatomíneos en las regiones Oriental y Centro-Occidental de Venezuela. Electroforesis en gel de Agarosa al 2% en TAE 1X, teñido con bromuro de etidio. Cada par de líneas corresponde a los productos de PCR sin digerir (SD), seguido por los productos digeridos (D) para: HSP60/*EcoRV* (**A**), GPI/*HhaI* (**B**), H1/*AatII* (**C**). De izquierda a derecha (M) Marcador de tamaño molecular 100 pb (Promega); (1-5) **Región Oriental**: VP150 (TcI), VP151 (TcIII), VP152 (TcIII), VP169 (TcIII), VP154 (TcI+TcIII); (6-10) **Región Centro-Occidental**: VP100 (TcI), VP129 (TcI), VP171 (TcI); VP176 (TcI); VP148 (TcI+TcIV).

B. Aislados de Mamíferos

El análisis mediante RFLPs en los aislados de *T. cruzi* obtenidos de mamíferos en las regiones Oriental y Centro-Occidental de Venezuela, indicó homogeneidad respecto a los haplotipos del parásito, puesto que todos los aislados amplificaron para TcI (Tabla 13; Figura 26). Dichos resultados confirman lo obtenido con ME, 24Sα y 18S.

Tabla 13. Haplotipos de *Trypanosoma cruzi* circulantes en mamíferos de las regiones Oriental y Centro-Occidental de Venezuela, establecidos mediante ensayos de PCR-RFLP.

Aislado	Marcador Molecular/ Tamaño molecular de bandas (pb)			Haplotipo/DTU
	HSP60 (EcoRV)	GPI (HhaI)	H1 (AatII)	
REGION ORIENTAL				
MEAS/VE/2009/CD112	462	817+447	364+122	TCI
MDID/VE/2012/CD113	462	817+447	364+122	TCI
MDID/VE/2009/CD116	462	817+447	364+122	TCI
MDID/VE/2009/CD118	462	817+447	364+122	TCI
MDID/VE/2009/CD120	462	817+447	364+122	TCI
MDID/VE/2009/CD160	462	817+447	364+122	TCI
MDID/VE/2012/CD162	462	817+447	364+122	TCI
MDID/VE/2013/CD164	462	817+447	364+122	TCI
MDID/VE/2013/CD165	462	817+447	364+122	TCI
MCTH/VE/2012/CD168	462	817+447	364+122	TCI
MDES/VE/2012/CD170	462	817+447	364+122	TCI
MODM/VE/2012/CD171	462	817+447	364+122	TCI
MPEC/VE/2012/CD173	462	817+447	364+122	TCI
REGION CENTRO-OCCIDENTAL				
MDID/VE/1992/CO16*	462	817+447	364+122	TCI
MRAT/VE/1993/CO22*	462	817+447	364+122	TCI
MDID/VE/1995/CO75*	462	817+447	364+122	TCI
MDID/VE/1995/CO79*	462	817+447	364+122	TCI
MRAT/VE/2012/CO84**	462	817+447	364+122	TCI
MDID/VE/2009/CD123	462	817+447	364+122	TCI
MDID/VE/2009/CD125	462	817+447	364+122	TCI
MDID/VE/2009/CD135	462	817+447	364+122	TCI
MDID/VE/2012/CD136	462	817+447	364+122	TCI
MDID/VE/2011/CD172	462	817+447	364+122	TCI

HSP60: Proteína de choque térmico; GPI: proteína de superficie; H1: Proteína nuclear; *EcoRV*, *HhaI*, *AatII*: enzimas de restricción. Lewis y col, (2009).* Aislado de laboratorio para comparación. ** Aislado de referencia del laboratorio.

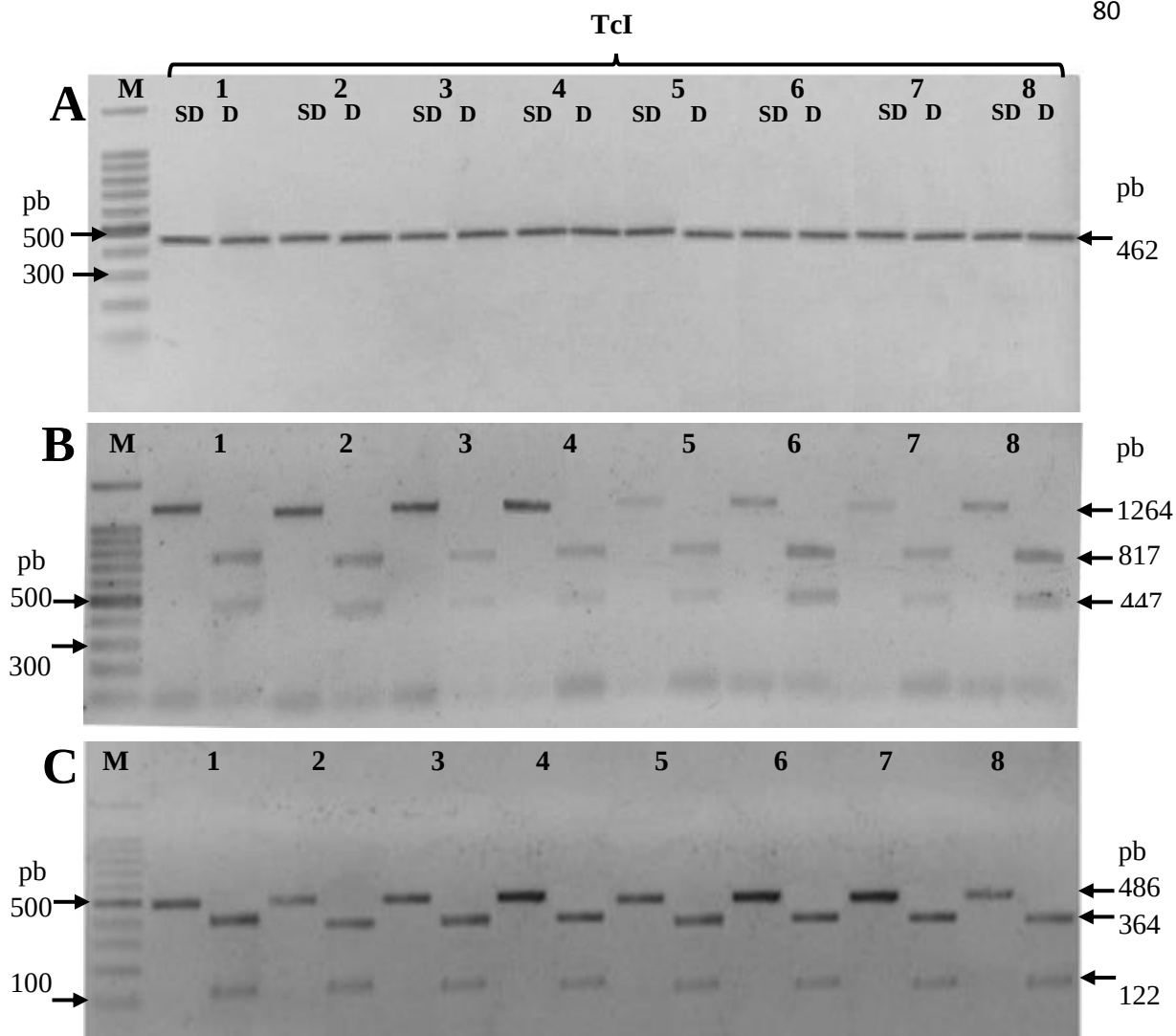


Figura 26. Perfiles de los haplotipos obtenidos mediante el análisis de los polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción (PCR-RFLPs) de los aislados de *Trypanosoma cruzi* provenientes de mamíferos en las regiones Oriental y Centro-Occidental de Venezuela. Electroforesis en gel de Agarosa al 2% en TAE 1X teñido con bromuro de etidio. Cada par de líneas corresponde a los productos de PCR sin digerir (SD), seguido por los productos digeridos (D) para HSP60/*EcoRV* (A), GPI/*HhaI* (B), H1/*AatII* (C). De izquierda a derecha: (M) Marcador de tamaño molecular 100 pb (Promega); (1-4) **Región Oriental:** CD160 (TcI), CD162 (TcI), CD168 (TcI), CD170 (TcI); (5-8) **Región Centro-Occidental:** CD123 (TcI), CD135 (TcI); CD136 (TcI), CD172 (TcI).

7.6. Distribución geográfica de los componentes del complejo ecopatogénico de *Trypanosoma cruzi* en Venezuela

El complejo ecopatogénico de la parasitosis en nuestro estudio estuvo formado por la triada epidemiológica constituida por triatomíneos (seis especies), mamíferos (diecisiete especies) y el parásito (tres genotipos), todos englobados dentro de un gran ecosistema con tres ecótopos (D, PD y S) en dos regiones geográficas de Venezuela (Oriental y Centro-Occidental).

La cantidad de individuos colectados por hospedador y su positividad al *T. cruzi* fluctuó para cada región geográfica. A nivel genotípico los aislados que presentaron heterogeneidad en los haplotipos, fueron los obtenidos de triatomíneos (Figura 27).

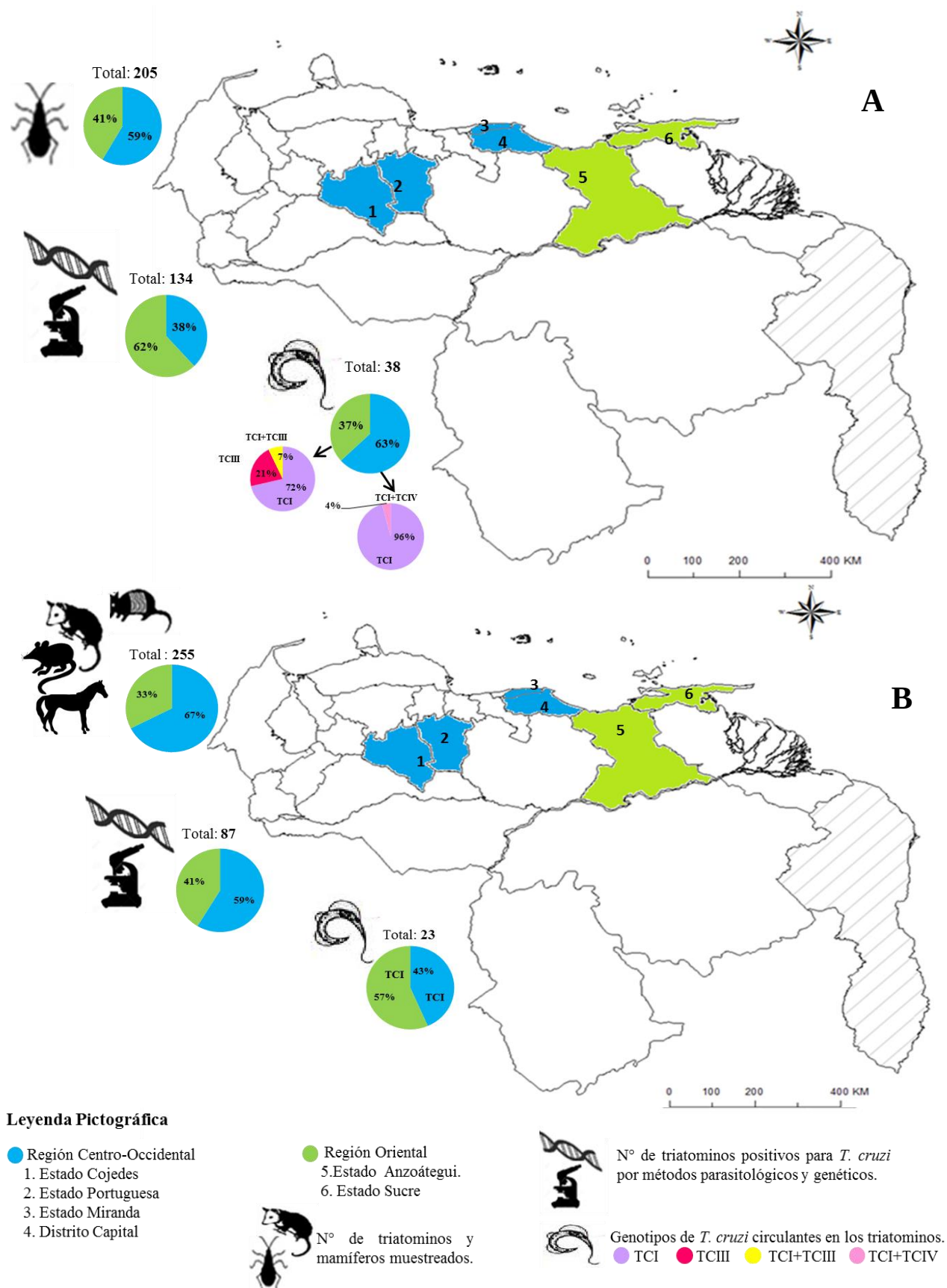


Figura 27. Distribución geográfica de los componentes del complejo ecopatogénico de la Tripanosomiasis Americana en Venezuela. A). Triatomines. B) Mamíferos. Diagrama: Lozano-Arias D, comunicación personal.

8. DISCUSION

La Tripanosomiasis Americana (TA) o Enfermedad de Chagas (ECh), es una parasitosis compleja que se manifiesta desde una enzootia a una antroponosis, dependiendo de la red trófica en la que se circunscriba y en la cual pueden participar varios grupos de triatominos y mamíferos, incluyendo al ser humano, siendo ésta determinada por una serie de características biológicas, socioculturales, políticas y económicas. Recientemente se ha considerado como una parasitosis reemergente condicionada por los cambios en los hábitats silvestres y urbanos generados por el hombre (Herrera, 2014; Díaz-Bello y col, 2016; WHO, 2016).

La TA en Venezuela ha sido tradicionalmente asociada al pie de monte Andino, al pie de monte Centro-Oriental y a las elevaciones de los llanos Centro-Occidentales (Rivera y col., 2000). Recientes estudios han revelado un aumento de la incidencia en zonas costeras y otras regiones del oriente y sur del país como son los estados Anzoátegui, Nueva Esparta y la Amazonia venezolana (Morocoima y col., 2008; Noya-Alarcón y col, 2011; Morocoima y col., 2012; Berrizbeitzia y col., 2014).

Los vectores en el ciclo de transmisión

En Venezuela, un 60% de los casos confirmados de ECh han sido reportados en Anzoátegui, Aragua, Barinas, Carabobo, Cojedes, Portuguesa, Trujillo y Yaracuy, siendo la mayoría de éstos asociados a la presencia de *R. prolixus* en el intradomicilio, por lo que esta especie ha sido considerada como un vector primario para un buen numero de estados y su presencia un factor de riesgo (Añez y col., 1999; Añez y col., 2004; Feliciangeli y col., 2004; Morocoima y col., 2010a, 2010b).

Los registros de triatominos en la región Centro-Occidental del país, ya sea por la visita ocasional o la colonización en la vivienda humana, ocurre principalmente por las especies tradicionalmente asociadas al peridomicilio como *T. maculata* y al hábitat silvestre como *P. geniculatus*, lo cual podría indicar un desplazamiento de estos insectos atraídos por la luz desde nichos silvestres cercanos, o bien por la disminución de los vertebrados como fuente de alimentación debido a la acción antrópica (Carrasco y col., 2005; Alarcón de Noya y col., 2010; Reyes-Lugo, 2011).

Los resultados acá expuestos, si bien son un estudio de entrada puntual en algunas de estas áreas mencionadas, revelaron una amplia diversidad de la triatominofauna, caracterizada por la presencia de ejemplares reportados previamente en la literatura tales como *P. geniculatus*, *T. maculata*, *R. prolixus*, *Ps. arthuri*, *E. cuspidatus* y *R. pictipes* (Gamboa, 1974; Otero, 1975; Aché, 1993; Cermeño J., 2013; García-Jordán y col., 2015).

La presencia de *T. cruzi* mediante métodos parasitológicos y moleculares en estas especies de triatomíneos (algunas de escaso registro en Venezuela), ratifican su potencial papel como vectores en el ciclo de transmisión doméstico, peridoméstico y silvestre (Reyes-Lugo 2009; Añez y col., 2009; Morocoima y col., 2010b; Cazorla-Perfetti y Nieves-blanco, 2010; Morocoima y col., 2011; Carrasco y col., 2012; Cruz-Guzmán y col., 2014; García-Jordán y col., 2015).

Los aislados de *T. cruzi* obtenidos de *R. prolixus*, *P. geniculatus* y *T. maculata*, presentaron variabilidad en los parámetros de la cinética de infección en modelo murino, con amplios periodos de infección, parasitemias bajas para un buen número de aislados y variabilidad en la mortalidad, coincidiendo con lo reportado para estas especies vectoras por autores tanto de Venezuela como de Brasil (Vergel y Urdaneta-Morales., 2007; Monteiro y col., 2012).

En los triatomíneos estudiados se identificaron mas de un genotipo de *T. cruzi*, con una mayor preponderancia del genotipo TcI, ocasionalmente TcIII en infecciones únicas y TcI+TcIV o TcI+TcIII en infecciones mixtas, revelando el papel de estos vectores como dispersadores del parásito. La asociación parasito-vector es mucho mas antigua que la de parasito-mamíferos hospedadores, originada cuando estos insectos eran primariamente predadores con incorporación secundaria de la hematofagia, lo cual favoreció su acción como verdaderas “jeringas biológicas” propagadoras de mas de un genotipo del parásito (Gaunt y Miles, 2000; Noireau y col., 2009).

Debido a que algunas especies silvestres como *Ps. arthuri* han sido reportadas en los estados Anzoátegui, Cojedes y Portuguesa con infección natural por el parásito, podrían considerarse como vectores crípticos que deberían vigilarse, debido al aumento de su frecuencia en los ecótopos peridomésticos, específicamente en nidos de aves, ubicados a

menos de cinco metros de la vivienda humana, en los cuales interactúan con otras especies de triatomíneos y algunos mamíferos. Estos triatomíneos podrían en cualquier momento migrar a las viviendas y estar en contacto con humanos y animales peridomésticos o domésticos, constituyendo un factor de riesgo (Cazorla-Perfetti y Nieves-Blanco, 2010; Cruz-Guzmán y col., 2014).

Específicamente el aislado proveniente de *Ps. arthuri* identificado en este trabajo, como genotipo TcIII, presentó un amplio periodo de infección con elevados valores de parasitemia y mortalidad correspondiente a un patrón de alta transmisibilidad, como lo es una carga parasitaria elevada y continua, lo cual ha coincidido con el comportamiento de otros aislados de *Ps. arthuri* en el Oriente del país (Cruz-Guzmán y col., 2014). El genotipo TcIII hallado en este triatómino y presente en algunos casos de ECh en latinoamérica, comienza a ser una subpoblación cuyo registro va en aumento en el país y puede ir adquiriendo importancia epidemiológica en la medida en que se le ha considerado propia de corredores biológicos entre el ambiente silvestre y el peridoméstico (Morocoima y col., 2012; Carrasco y col., 2012; Cruz-Guzmán y col., 2014; Martins y col., 2015).

La especie *E. cuspidatus*, reportada en Venezuela por Tejera (1919), considerada potencial vector y asociada principalmente a ecótopos domésticos y peridomésticos, ha sido poco estudiada. Durante este estudio fue posible obtener de esta especie de triatómino un aislado de *T. cruzi*, el cual fue caracterizado genotípicamente como TcI, con periodo de infección corto y baja virulencia reflejada en baja parasitemia y poca mortalidad en el modelo murino. Estos resultados son la primera tipificación para un aislado de *T. cruzi* proveniente de *E. cuspidatus* en Venezuela. Resultados anteriores revelaron la presencia del genotipo TcI en triatóminos del género *Eratyrus*, específicamente en la especie *E. mucronatus* la cual fue encontrada en zonas muy cercanas a las del presente muestreo, dicha especie ha sido considerada de más reciente especiación (Cazorla-Perfetti y Nieves-blanco, 2010; Morocoima y col., 2010b).

La especie *R. pictipes*, ha sido considerada desde 1975 una especie vectora en el ciclo silvestre de *T. cruzi*, asociada con palmas, bromelias, cuevas de mamíferos y árboles secos, teniendo como fuente de alimentación aves, murciélagos, marsupiales y roedores. Esta especie, con pocos registros en el país, ha presentado infección mixta con *T. cruzi* y *T.*

rangeli. Su alto grado de adaptación a ambientes sinantrópicos ha favorecido su presencia en ambientes domésticos y peridomésticos, en los cuales contacta con animales domésticos y con el hombre (Carcavallo y col, 1999; Cazorla-Perfetti y Nieves-Blanco, 2010).

Los resultados expuestos, mostraron la presencia de *R. pictipes* asociado a ecótopos peridomésticos, con 100% de positividad para *T. cruzi* y 0% para *T. rangeli*, con infecciones de virulencia media evidenciada en un periodo de infección prolongado, moderada parasitemia y bajo porcentaje de mortalidad en el modelo murino, dicho aislado fue identificado como TcI. Nuestros resultados son el primer estudio en el cual se caracteriza biológica y genotípicamente aislados de *T. cruzi* obtenidos de esta especie de triatmino en Venezuela.

El potencial papel epidemiológico estaría definido en orden de importancia para *P. geniculatus*, seguido de *T. maculata* y *R. prolixus* todos evidenciando un potencial proceso de domiciliación, por su presencia en la vivienda humana y en algunos casos con existencia de estadios ninfales (específicamente para *T. maculata*). Estos hallazgos coinciden con lo planteado por otros autores para algunas localidades de Venezuela, quienes han señalado a estas tres especies como las de mayor importancia epidemiológica por su reciente incursión en el domicilio, en muchas ocasiones en condiciones de simpatría (Reyes-Lugo y Rodríguez-Acosta, 2000; Feliciangeli y col., 2004; Morocoima y col., 2008; Morocoima y col., 2010a; Reyes-Lugo, 2009; García y col., 2011; García-Alzate y col., 2014).

El mamífero en el ciclo de transmisión

En el presente trabajo se estudió una gran diversidad de especies de mamíferos actuando como potenciales reservorios para *T. cruzi*, específicamente para el genotipo TcI, con capacidad de interactuar con triatomino vectores y con el hombre, pudiendo conformar complejos ecopatogénicos (Rivera y col., 2000; Crisante y col., 2006; Añez y col., 2009; Herrera, 2010; Carrasco y col., 2012; Morocoima y col., 2012; Berrizbeitia y col., 2013; Acosta y López, 2013; Herrera, 2014).

La participación activa de estos mamíferos (la mayoría juveniles) en el ciclo de transmisión doméstico y/o peridoméstico, con parasitemias crípticas estaría indicando su

papel como reservorios que mantienen una circulación del parásito por mas tiempo y por ende garantizan su transmisibilidad, aumentando el riesgo de infección en nuevos hospedadores.

La positividad a *T. cruzi* de animales domésticos empleados para la ganadería y pecuaria en los resultados expuestos, es de importancia epidemiológica ya que en situaciones críticas en la práctica agropecuaria, se concentraría la población de estos animales en áreas reducidas conllevando al hacinamiento, para ahorro de alimento, agua y mano de obra para el manejo. Esta agregación facilitaría la atracción de vectores, forzando un cuello de botella, y creando mayor riesgo de transmisibilidad, en ciclos de transmisión artificialmente favorecidos (Levy y col., 2015).

Otro aspecto de importancia en lo anteriormente expuesto, es la posibilidad de transmisión de *T. cruzi* a los seres humanos implicados en el manejo pecuario, a sus familiares, o bien en una ruta de comercialización pecuaria, mediante la manipulación de carne cruda y/o consumo de carne poco cocida con estadios sanguícolas circulantes del parásito como ha sido registrado por otros autores (Botto- Mahan y col., 2008)

En los resultados expuestos, la positividad a *T. cruzi* en perros domésticos, constituye un aporte importante a los pocos estudios realizados en Venezuela, en relación al papel del perro en el ciclo de transmisión; haciéndose necesario dilucidar su importancia como reservorio o bien como hospedador incidental. El perro debería estar considerado en los programas de vigilancia, por su papel como centinela de la TA en áreas con re-emergencia post control químico de vectores o post tratamiento de la población humana, así como en áreas no endémicas en las cuales pudiese actuar como indicador del surgimiento de la zoonosis (Fujita y col, 1994; Crisante y col., 2006; Berrizbetzia y col., 2013; Castillo-Neyra y col, 2015; Levy y col., 2015; Gurtler y Cardinal., 2015; Yauri y col., 2016).

Mamíferos del género *Didelphis*, han sido considerados en algunos ecosistemas como reservorios sinantrópicos primarios, con amplia distribución geográfica, hábitos omnívoros, y nichos eclécticos, incluyendo las viviendas humanas en las cuales se presenta con alta frecuencia. Estos marsupiales, propios de los corredores entre ambientes silvestres y domésticos, poseen altas tasas de infección y pueden eliminar formas infectantes en la orina

y en el contenido de sus glándulas anales, contaminando eventualmente los alimentos y enseres en el peridomicilio y domicilio, sin eventos de transmisión relacionados con la carnivoría (Deane y col., 1986; Herrera y Urdaneta-Morales, 1992; Urdaneta-Morales y Nironi, 1996; Schweigmann y col., 1999; Ramsey y col., 2012; Díaz-Bello y col., 2016).

En este estudio *D. marsupialis* fue la especie de mamíferos silvestres o peridomésticos, con mayor prevalencia, de los cuales la mitad fueron portadores de *T. cruzi* (exclusivamente TcI) pudiendo ser considerados como potenciales reservorios del parásito. Los aislados del parásito obtenidos de estos mamíferos revelaron en el modelo murino la capacidad de tener largos periodos de infección con carga parasitaria continua, valores bajos de parasitemia y porcentaje de mortalidad variable, lo cual garantizaría continua transmisibilidad, independientemente del área geográfica.

Algunos mamíferos silvestres componentes de la fauna cinegética tales como *T. tetradactyla*, *O. margaritae*, *D. novencintus*, *P. tajacu*, *C. paca*, *C. thous* entre otros, han sido registrados pocas veces como positivos a *T. cruzi* en Venezuela y en otras áreas de América, estas especies podrían actuar como reservorios y dispersar la parasitosis, especialmente cuando son utilizados en la cadena alimenticia del humano, no obstante es necesario profundizar en el estudio para establecer su dinámica poblacional dentro del ciclo de transmisión (Herrera, 2010). En nuestro estudio los aislados de *T. cruzi* obtenidos de estos mamíferos, presentaron en el modelo murino un comportamiento biológico similar al de los didelfidos, con largos periodos de infección, baja carga parasitaria, mas con 100% de mortalidad, siendo patógenos, con excepción del aislado de *P. tajacu* el cual produjo baja mortalidad.

Algunos autores también han reportado la presencia de *T. cruzi* (específicamente TcI) en mamíferos de los géneros *Odocoileus* y *Tayassu* (Carrasco y col, 2012); sin embargo, nuestros resultados constituyen el primer abordaje que compila la caracterización biológica y genotípica de aislados del parásito provenientes de estos géneros.

Igualmente, en estudios previos en ejemplares de *D. rotundus* y *C. thous* en Venezuela, no encontraron positividad al parásito (Acosta y López, 2013), contrario a lo acá reportado

donde se estableció la presencia de *T. cruzi* en dichas especies de mamíferos, lo cual es un aporte para los registros en Venezuela.

La participación de estos mamíferos en los ciclos de transmisión del parásito, permitiría inferir que el nicho que ocupan favorece el encuentro hospedador-parásito, favoreciendo el establecimiento de la parasitosis (Herrera, 2014; Jansen y col., 2015).

De los resultados se deriva la importancia de conocer las parasitosis que circulan en la fauna silvestre y doméstica, especialmente en los animales que juegan un papel fundamental en la economía de cada región y país, lo cual favorecería la detección temprana de una amplia gama de zoonosis y parasitosis emergentes, útiles en las medidas de control.

Comportamiento biológico del parásito en el modelo murino

El modelo murino ha sido comúnmente utilizado para simular el desarrollo de la TA o ECh, puesto que permite reproducir las fases de la parasitosis y el parasitismo tisular, lo cual podría ser análogo a la infección en humanos, incluyendo mecanismos patogénicos, electrocardiográficos, evolución de la respuesta inmunológica y ensayos quimioterapéuticos (Rivera y col., 2000; Moreno y col., 2002; Vergel y Urdaneta-Morales, 2007).

En el presente trabajo se utilizó un modelo murino con un inóculo de baja virulencia simulando lo que pudiese estar ocurriendo en la naturaleza, al darse la transmisión de forma vectorial. El comportamiento parasitológico observado fue variable, con un amplio rango de infección patente, desde valores pequeños hasta casi dos meses para la circulación y disponibilidad del parásito para la transmisibilidad, al igual que la fluctuación en la mortalidad, especialmente en los aislados obtenidos de triatominos independientemente de la especie y región geográfica. Esta heterogeneidad biológica de los aislados, aún cuando no fuese significativa al comparar todas las variables a la vez, podría estar asociada con la capacidad de adhesión, invasión y proliferación del parásito en el hospedador, controladas por la respuesta inmunológica, virulencia, patogenicidad y mortalidad de los aislados como ha sido planteado por algunos autores (Vergel y Urdaneta-Morales., 2007; Suarez y col, 2009, Andrade y col., 2011).

Datos estadísticamente significativos, no siempre dan información de todos los interrogantes, ya que hay data que puede ser relevante desde el punto de vista conceptual aún cuando no sea significativa (Pértega y Pita, 2001).

Los valores de máxima parasitemia acá observados, resultaron estadísticamente significativos para los aislados de triatomíneos en comparación con los de mamíferos, con mayor carga parasitemica para los primeros, lo cual hace al parásito siempre disponible para la transmisibilidad. Los aislados de *T. cruzi* mostraron diferencias en la cinética de infección, virulencia y patogenicidad en función de la fuente de origen (triatomíneos y mamíferos), tal como lo han citado otros autores (Macedo y Pena., 1998; Guzmán-Marín y col., 1999).

El eclecticismo en el parasitismo tisular de los aislados estudiados, se vio representado en la diversidad e intensidad de tejidos invadidos, con preponderancia del miotropismo chagásico experimental, más con invasión de tejidos tales como cerebro, bazo, hígado, riñón, pulmón y páncreas, en los cuales no se superó el parasitismo escaso o moderado, reflejando macrófago tropismo y paninfectividad (Rivera y col, 2000; Herrera y col., 2005; Cruz-Guzmán y col, 2014).

El parasitismo tisular en cerebro y pulmón, con presencia de pseudoquistes, parasitismo leve e inflamación para aislados de *T. cruzi* obtenidos de triatomíneos y mamíferos en Venezuela, México y Brasil es un hecho ya citado (de Scorza y col., 1996; Melnikov y col., 2005; Vergel y Urdaneta-Morales, 2007; Morocoima y col, 2008; Cruz-Guzmán y col., 2014; Urdaneta-Morales, 2014). Este tipo de parasitismo en tejidos poco frecuentes, puede indicar un potencial riesgo de infección, especialmente en prácticas como el transplante de órganos y otros manejos que impliquen contacto con fluidos corporales, lo cual abre puerta a nuevos mecanismos de transmisión (Urdaneta-Morales, 2014).

Andrade y col. (2011), plantearon que el aumento de la afectación histopatológica, podría deberse a la persistencia del parásito en el tejido, siendo que la parasitemia en *T. cruzi* es producto del parasitismo celular. En el presente estudio esta relación fue notada en el 2,56% de los aislados, en los cuales el periodo de infección patente fue mayor a 15 días, con alta parasitemia y una amplia cantidad de tejidos invadidos por el parásito, confirmando su alto grado de complejidad.

Los aislados de la región Centro-Occidental independientemente de la fuente de origen del parásito, presentaron un mayor espectro histotrópico comparado con los aislados de la región Oriental.

La comparación de los parámetros del comportamiento biológico entre triatominos y mamíferos mediante ACP, reveló una segregación de los aislados según la fuente de origen, siendo que los aislados de triatominos fueron más similares entre sí, al igual que los mamíferos entre sí, siendo la mortalidad y el parasitismo tisular los parámetros que contribuyeron mas a esta segregación, principalmente en los aislados de triatominos La cantidad y localización de los parásitos en los tejidos en el modelo experimental de infección con *T. cruzi*, presentó variaciones en el tropismo tisular, mas en la mayoría de los casos no fue posible establecer una fuerte correlación entre parasitemia, lesión tisular, fuente y origen geográfico del aislado; algunos autores han planteado que elevadas parasitemias y mortalidad no siempre significan una alta tasa de invasión tisular (Cover y col., 1978; Guzmán-Marín y col., 1999).

Genotipos del parásito

En este estudio el diagnóstico molecular del parásito en hospedadores (triatominos y mamíferos) parasitológicamente negativos, podría indicar que para el momento del diagnóstico morfológico los tripomastigotes estaban circulando en baja cantidad y pudo no haberse detectado su presencia por examen directo o xenodiagnóstico. Esto ratifica la importancia de la implementación de estas herramientas en el diagnóstico certero del parásito en los diferentes hospedadores, para prevenir el reporte de un resultado dudoso o erróneo.

De acuerdo con la caracterización genotípica de los aislados en la presente investigación, se encontró homogeneidad en los aislados de *T. cruzi* obtenidos de mamíferos con 100% de amplificación para TcI, independientemente de la especie mamífero, ecótopo y región geográfica. Para los aislados obtenidos de triatominos se observó un comportamiento diferente caracterizado por heterogeneidad en los genotipos, siendo TcI el de mayor prevalencia, seguido del genotipo TcIII y una pequeña representación de genotipos mixtos TcI+TcIII y TcI+TcIV.

La presencia del genotipo TcI en los tres ecótopos de ambas regiones geográficas indicaría su transmisión entre los hospedadores independientemente del ecótopo en el que circulen, rompiendo la clásica concepción de asociar un genotipo con un ciclo de transmisión específico (Teixeira y col., 2006; Zingales y col., 2012). La amplia gama de especies de hospedadores poco asociados con este genotipo tales como: *E. cuspidatus*, *R. pictipes*, *O. margaritae*, *D. rotundus*, *P. tajacu* y *C. thous*, son un resultado novedoso que explicaría porque este genotipo es de amplia dispersión en el país (TcI ampliamente distribuido por encima de la cuenca amazónica) quizás condicionado por el nicho que ocupada especie de mamífero o vector y su papel en el ciclo de transmisión (Miles y col., 2003; Feliciangeli y col., 2003; Añez y col., 2009; Carrasco y col., 2005; Carrasco y col., 2012; Rivera y col., 2015).

El genotipo TcIII hasta ahora considerado mas común en los países al sur de la cuenca amazónica y asociado al ciclo silvestre con *P. geniculatus* como vector principal, viene apareciendo en Venezuela como un genotipo menos frecuente que TcI, tradicionalmente asociado con *D. novemcinctus*, *D. marsupialis*, *P. geniculatus* y *Ps. arthuri*, tal y como fue verificado en los resultados acá expuestos (Miles y col., 2003; Carrasco y col., 2012; Zingales y col., 2012; Cruz-Guzmán y col., 2014; Rivera y col., 2015). Los datos no permiten establecer una asociación estricta entre un genotipo y un hospedador específico, pero contribuyen a conocer aún mas la participación de *P. geniculatus* como vehiculador de TcIII en la región Oriental (Carrasco y col., 2012).

La circulación de mas de un genotipo del parásito en triatominos de ecótopos peridomésticos estaría asociada con los hábitos alimenticios eclécticos de estos vectores, en los cuales no se ha encontrado una asociación exclusiva con algún tipo de mamífero, actuando como “jeringas naturales” del parásito.

Los registros de infecciones mixtas dada por las combinaciones entre los haplotipos TcI con TcIV y TcIII, son escasos en Venezuela donde la mayoría de los genotipos se manifiestan como infecciones únicas en diferentes hospedadores para una misma región geográfica (Añez y col., 2009; Lisboa y col., 2009; Lewis y col., 2009; Carrasco y col.,

2012; Rivera y col., 2015). Es por ello que nuestros hallazgos de infecciones mixtas, constituyen un aporte en el conocimiento del complejo ecopatogénico de la parasitosis.

Según la nueva clasificación de Zingales y col., (2009) y Lewis y col, (2009), podría existir la presencia del genotipo TcV ó TcVI en los aislados de *T. cruzi* aca descritos, genotipos éstos de circulación restringida al cono sur. Sin embargo con los marcadores moleculares empleados, no fue posible establecer diferencias en los patrones de bandas que permitieran determinar definitivamente si estos haplotipos se están presentando como mixtos o como un genotipo circulante no reportado en el país, por lo que se hace necesario emplear otros marcadores moleculares, la secuenciación o bien el diagnóstico molecular con ADN obtenido de tejidos parasitados de animales de experimentación, lo que pudiese vislumbrar procesos de selección de clones del parásito en las subpoblaciones que circulan en el país

Algunos autores han planteado que algunos aislados de *T. cruzi* pueden ser mixtos presentando más de un genotipo del parásito y que esta variabilidad puede hacerse mas homogénea a medida que transcurre el tiempo de infección, ya que algunos genotipos pueden ser eliminados probablemente como resultado de factores inmunológicos del hospedador que pudiesen definir incapacidad de mantenerse en los mismos (Macedo y Pena., 1998; Andrade y Magalhes, 1997). Sin embargo, en nuestros resultados los genotipos mixtos se mantuvieron en el tiempo a través de pases por triatominos, mamíferos (modelo murino) y medios de cultivo.

Los resultados mostrados no permitieron establecer una relación entre la cinética de infección, el parasitismo tisular, las subpoblaciones circulantes del parásito, el ecótopo y el origen de los aislados, a diferencia de otras investigaciones en las cuales se ha encontrado una asociación del genotipo TcI con parasitemias mas bajas o bien otros estudios en los cuales se plantean que el polimorfismo genético de las subpoblaciones de *T. cruzi* podría influenciar el parasitismo (Andrade y Magalhes, 1997; de Lana y col., 2000; Macedo y col., 2002; Botero y col., 2007).

Estado del Arte

Trypanosoma cruzi es un hemoflagelado constituido por un complejo de subpoblaciones heterogéneas, sobre las cuales se ejercen presiones artificiales y naturales, tales como la extensión incontrolada de las urbes hacia bosques y sabanas, deforestación, migración de los hospedadores especialmente mamíferos (incluyendo al humano) desde los paisajes silvestres y rurales a los suburbanos y urbanos conduciendo a la selección de tales subpoblaciones.

La relación parásito-hospedador en las parasitosis, constituye parte de un sistema mayor, representado por comunidades y ecosistemas en los cuales se encuentran todos los elementos de la asociación.

El fenómeno de las enfermedades emergentes, olvidadas o remergentes, sólo es comprendido teniendo en cuenta la perspectiva de lo complejo, puesto que dichas enfermedades implican mecanismos ecológicos y evolutivos que participan en el paso de los ambientes silvestres a los domésticos y viceversa (Horwitz y Wilcox, 2005).

Los estudios relacionados con reservorios son de importancia para los estamentos encargados de la elaboración de estrategias de control y de vigilancia epidemiológica, porque permiten evaluar la dinámica de transmisión del agente causal de la Enfermedad de Chagas en zonas endémicas y el riesgo que implicaría la presencia de estos reservorios en áreas cercanas a las viviendas humanas, asociado con ciertas costumbres, como la caza y el consumo de animales silvestres.

No obstante con una entrada puntual como la expuesta se hace difícil definir el papel de determinada especie de mamífero como reservorio, puesto que los ensayos no permiten establecer longitudinalmente si las poblaciones de los parásitos están circulando por largo tiempo en cada grupo de esta mastofauna y si en todos los casos hay una carga parasitaria que garantice la transmisibilidad. De acuerdo con lo anterior, se requeriría un mayor conocimiento sobre la densidad poblacional de cada mamífero en las diferentes áreas de muestreo y un estudio que permitiese aclarar su papel como reservorios ya sean primarios o secundarios y precisar aún más los elementos del complejo ecopatogénico que estamos estudiando (Herrera, 2010; Herrera, 2014).

Así mismo, es necesario ampliar la investigación a nivel entomológico y epidemiológico sobre triatomíneos y mamíferos, especialmente en los géneros poco estudiados que permitan esclarecer su incidencia en el ciclo de transmisión de la parasitosis en las áreas estudiadas y establecer posibles medidas de control.

Las investigaciones sobre la TA en Venezuela han sido enfocadas generalmente en el comportamiento clínico y epidemiológico, ocasionalmente algunos investigadores han analizado el comportamiento biológico de la parasitosis pero en forma separada y no como un conjunto. Así han resultado escasos los estudios de aislados de *T. cruzi* obtenidos de diferentes triatomíneos y mamíferos, que involucren tanto los aspectos biológicos como genotípicos al mismo tiempo permitiendo esclarecer aspectos del complejo ecopatogénico que brinden un aporte en la modelación del comportamiento de la parasitosis en la naturaleza.

Teniendo en cuenta la heterogeneidad en el comportamiento biológico, histotrópico y genotípico observada en los aislados del parásito obtenidos en el presente estudio, se ha confirmado la existencia del complejo ecopatogénico de la Trypanosomiasis Americana.

Con el modelo murino de baja virulencia, no fue posible esclarecer patrones de infección asociados al genotipo, más si fue posible modelar el comportamiento biológico del parásito, permitiendo conocer las interacciones con el hospedador para aislados de diferentes ecótopos y regiones geográficas, información que contribuye para orientar estrategias de control de la parasitosis en el territorio Nacional.

Es necesario continuar con el desarrollo de investigaciones multidisciplinarias que involucren ámbitos biológicos, bioquímicos, moleculares, zoológicos y epidemiológicos que contribuyan con la comprensión holística no sólo de la TA, sino también de los demás sistemas parasitarios que tanto afectan a las poblaciones humanas y animales en el planeta

9. CONCLUSIONES

- La gama de especies de triatominos y mamíferos muestreados, positivos a *T. cruzi*, permitió actualizar su distribución, prevalencia de infección y la importancia de las mismas en la transmisión de la parasitosis.
- La caracterización biológica de los aislados de *T. cruzi* estudiados, reveló variabilidad asociada principalmente a la fuente del parásito.
- La caracterización genotípica reveló homogeneidad para los aislados obtenidos de mamíferos (TcI) y heterogeneidad para los de triatominos con infecciones mixtas (TcI, TcIII; TcI+TcIII; TcI+TcIV), siendo necesario ampliar en la búsqueda de nuevos haplotipos.
- La caracterización biológica y genotípica **en forma simultanea** de los aislados estudiados, en especial la de hospedadores poco frecuentes como *R. pictipes*, *Ps. arthuri*, *E. cuspidatus*, *O. margaritae*, *C. thous*, *D. rotundus* y *P. tajacu*, constituye un abordaje precursor sobre el análisis del complejo ecopatogénico.

10. RECOMENDACIONES

- Realizar un estudio longitudinal a fin de poder establecer con mayor exactitud el posible papel de las especies de mamíferos y triatomíneos, como hospedadores del parásito.
- Ampliar el seguimiento de la parasitosis en el modelo murino en cada una de sus fases, favoreciendo el conocimiento de mas elementos para establecer una asociación del comportamiento del parásito según la fuente de origen, ecótopo o región geográfica.
- Realizar la caracterización molecular sobre los órganos evaluados en el modelo y contrastar con los haplotipos obtenidos en medios de cultivo, y así esclarecer posibles fenómenos de eliminación o selección de haplotipos.
- Para conocer aún mas la variabilidad de los haplotipos de *T. cruzi*, se podrían implementar otros estudios tales como análisis de microsatélites, variabilidad estudiada *in silico*, secuenciación, entre otros.

11.BIBLIOGRAFIA

Aché A, Matos A. Interrupting Chagas' disease transmisión in Venezuela. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*. 2001; 43: 37-43. <http://dx.doi.org/10.1590/S0036-46652001000100008>.

Aché A. Programa de control de la enfermedad de chagas en Venezuela. *Boletín de la Dirección de Malariología y Saneamiento Ambiental*. 1993; 33:11-17.

Acosta N, López E. Reservorios mamíferos del *Trypanosoma cruzi* en Paraguay Mammalian reservoirs of *Trypanosoma cruzi* in Paraguay. *Memorias del Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud*. 2013; 11(2): 90-96.

Alarcón de Noya B, Díaz-Bello Z, Colmenares C, Ruiz-Guevara R, Mauriello L, Zavala-Jaspe R, y col. Large urban outbreak of orally acquired acute Chagas disease at a school in Caracas, Venezuela. *Journal of Infection Disease*. 2010; 201(9):1308-15. [doi:10.1086/651608](https://doi.org/10.1086/651608).

Alarcón de Noya B, Díaz-Bello Z, Colmenares C, Zavala-Jaspe R, Abate T, Contreras R, y col. The performance of laboratory tests in the management of a large oral Chagas Disease outbreak. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2012. 107(7): 893.898. <http://dx.doi.org/10.1590/S0074-02762012000700009>.

Alarcón de Noya B, Díaz-Bello Z, Colmenares C, Zavala-Jaspe R, Mauriello L, Díaz MP, y col. Transmisión urbana de la enfermedad de Chagas en Caracas, Venezuela: aspectos epidemiológicos, clínicos y de laboratorio. *Revista Biomed*. 2009; 20:158-164.

Alarcón de Noya, B. Enfermedad de Chagas en Caracas. *Revista de la facultad de ciencias de la salud. Salus*. 2008; 12:4-5.

Andrade S, Magalhães J. Biodemes and zymodemes of *Trypanosoma cruzi* strains: correlations with clinical data and experimental pathology. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 1997; 30: 27-35

Andrade SG, Campos RF, Steindel M, Guerreiro ML, Magalhães JB, Almeida MC, y col. Biological, biochemical and molecular features of *Trypanosoma cruzi* strains isolated from patients infected through oral transmission during a 2005 outbreak in the state of Santa Catarina, Brazil: its correspondence with the new *T.cruzi* Taxonomy Consensus (2009). *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2011; 106 (8):948-956. [doi: 10.1590/S0074-02762011000800009](https://doi.org/10.1590/S0074-02762011000800009).

Anonymous. Recommendations from a satellite meeting. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. 1999; 94(1):429-432. <http://dx.doi.org/10.1590/S0074-02761999000700085>.

Añez N, Carrasco H, Parada H, Crisante G, Rojas A, González N, y col., Acute Chagas' Disease in western Venezuela: A clinical, seroparasitologic and epidemiologic study. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. . 1999; 60: 215- 222.

Añez N, Crisante G, Añez-Rojas N, Rojas A, Moreno G, y col. Genetic typing of *Trypanosoma cruzi* isolates from different hosts and geographical areas of western Venezuela. *Boletín de Malariología y Salud Ambiental*. 2009; 49(2): 251-258.

Añez N, Crisante G, Parada H. Nuevos casos de enfermedad de Chagas en el Occidente de Venezuela. *Revista de la facultad de ciencias de la salud. Salus*. 2007; 11(1):87-90.

Añez N, Crisante G, Rojas A, Dávila D. Brote de enfermedad de Chagas agudo de posible transmisión oral en Mérida, Venezuela. *Boletín de malariología y salud ambiental*. 2013; 53 (1): 1-11.

Añez N, Crisante G, Rojas A, Díaz N, Añez-Rojas N, Carrasco H y col. La cara oculta de la

enfermedad de Chagas en Venezuela. *Boletín de la Dirección de Malariología y Saneamiento Ambiental*. 2003; 43(2): 45-57.

Añez N, Crisante G, Rojas A. Update on Chagas disease in Venezuela- A review. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2004; 99(8): 781-787. <http://dx.doi.org/10.1590/S0074-02762004000800001>.

Araujo-Jorge TC, Telleria J, Rios-Dalenz, J. History of the Discovery of American Trypanosomiasis (Chagas Disease). Capítulo 1. En: Telleria J. y Tibayrenc M. American Trypanosomiasis Chagas Disease. One Hundred Years of Research. *El Sevier*. First edition. 2010; p 3-82.

Aufderheide AC, Salo W, Madden M, Streitz J, Buikstra J, Guhl F, y col. A 9,000-year record of Chagas' disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2004; 101 (7):2034-2039. doi: [10.1073/pnas.0307312101](https://doi.org/10.1073/pnas.0307312101)

Barnabé C, Brisse S, Tibayrenc M. Population structure and genetic typing of *Trypanosoma cruzi*, the agent of Chagas disease: a multilocus enzyme electrophoresis approach. *Parasitology*. 2000; 120: 513-526.

Barreto MP. Epidemiología. En: *Trypanosoma cruzi e doença do Chagas* (Brenner Z, Andrade Z y col.), Guanabara-Koogan.1979; 89-151.

Bautista NL, García de la Torre GS, De Haro I, Salazar-Shettino PM. Importance of *Triatoma pallidipennis* (Hemiptera: Reduviidae) as a vector of *Trypanosoma cruzi* (Kinetoplastida: Trypanosomatiidae) in the state of Morelos, México and possible ecotopes. *Journal of medical entomology*. 1999; 36:233-5. <http://dx.doi.org/10.1093/jmedent/36.3.233>.

Benaïm-Pinto H. Resultados preliminares de una encuesta de reconocimiento sobre Enfermedad de Chagas y Tripanosomiasis rangeli en un sector del valle de Caracas (Petare, Edo. Miranda). *Revista Policlínica Caracas*. 1949; 18:103-17.

Berrizbeitia M, Concepción JL, Carzola V, Rodríguez J, Cáceres A, Quiñones W. Seroprevalencia de la infección por *Trypanosoma cruzi* en *Canis familiaris* del estado Sucre, Venezuela. *Biomédica* 2013; 33(2):214-225. <http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v33i2.760>

Berrizbeitia M, González F, Ndao M, Ward B, Rodríguez J, Cortéz Y. Seroprevalencia de infección por *Trypanosoma cruzi* en bancos de sangre públicos del oriente de Venezuela. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*. 2014; 34:43-48.

Botero LA, Mejía AM, Triana O. Caracterización biológica y genética de dos clones pertenecientes a los grupos I y II de *Trypanosoma cruzi* de Colombia. *Biomédica*. 2007; 27(1): 64-74.

Botto-Mahan C, Acuña-Retamar M, Campos R, Cattán P, Solar A. European Rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) are naturally infected with different *Trypanosoma cruzi* genotypes. *American Journal of Tropical medicine and Hygiene* 2009; 80(6): 944-946.

Brenner Z, Andrade Z.A, Barral-Neto M. *Trypanosoma cruzi e doença do Chagas*. Segunda edição. Guanabara Koogan. 2000.

Brenner Z. Therapeutic activity and criterion of cure on mice experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*. 1962; 4: 389-396.

Briceño-León R. La enfermedad de Chagas en las Américas: una perspectiva de ecosalud. *Cadernos Saude Publica*. 2009; 25(1):71-82. <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-311X200900130000>

Briones MRS, Souto RP, Stolf BS, Zingales B. The evolution of two *Trypanosoma cruzi* subgroups inferred from rRNA genes can be correlated with the interchange of American

mammalian faunas in the Cenozoic and has implications to pathogeniticy and host specificity. *Molecular and Biochemical Parasitology*. 1999; 104:219-232. <http://dx.doi.org/10.1016/S0166-6851%2899%2900155-3>.

Brisse S, Verhoef J, Tibayrenc M. Characterization of large and small subunit rRNA and mini-exon genes further supports the distinction of six *Trypanosoma cruzi* lineages. *International Journal for Parasitology*. 2001; 31:1218-1226. <http://dx.doi.org/10.1016/S0020-7519%2801%2900238-7>.

Britto C, Cardoso MA, Wincker P, Morel CM. A simple protocol for the physical cleavage of *Trypanosoma cruzi* kinetoplast DNA present in blood samples and its use in polymerase chain reaction (PCR)-based diagnosis of chronic Chagas disease. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. 1993; 88: 171-172. <http://dx.doi.org/10.1590/S0074-02761993000100030>

Buscaglia CA, Di Noia JM. *Trypanosoma cruzi* clonal diversity and epidemiology of Chagas disease. *Microbes and Infection*. 2003; 5(5): 419-427. [doi:10.1016/S1286-4579\(03\)00050-9](http://dx.doi.org/10.1016/S1286-4579(03)00050-9)

Calderón-Arguedas O, Troyo A, Valerio I, Chinchilla M. Heterogeneidad clonal en epimastigotos de una cepa centroamericana de *T. cruzi* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae). *Parasitología Latinoamericana*. 2002; 57:40-5. <http://dx.doi.org/10.4067/S0717-77122002000100010>

Carcavallo RU, Galíndez I, Jurberg J, Lent H. Atlas of Chagas' disease vectors in the Americas. Dos vectores da doença de Chagas nas Américas. *Edit. FioCruz*. 1999; 3:747-890.

Carrasco HJ, Segovia M, Llewellyn MS, Morocoima A, Urdaneta-Morales S, Matinez C, y col. Geographical Distribution of *Trypanosoma cruzi* Genotypes in Venezuela. *PLoS Neglected Tropical Diseases*. 2012; 6(6): e1707. <http://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001707>

Carrasco HJ, Torrealba A, García C, Segovia M, Feliciangeli MD. Risk of *Trypanosoma cruzi* I (Kinetoplastida:Trypanosomatidae) transmission by *Panstrongylus geniculatus* (Hemiptera: Reduviidae) in Caracas (Metropolitan District.) and neighboring States, Venezuela. *International Journal for Parasitology* 2005; 35 (1):1379-1384. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpara.2005.05.003>

Castillo JJ. Non-Probability Sampling. 2009. Explorable: <http://explorable.com/non-probability-sampling.html> Acceso: 14 Noviembre 2012.

Castillo-Neyra R, Chou-Chu L, Quispe-Machaca V, Ancca-JuarezJ, ,Malaga-Chavez FS, Bastos M. The potential of canine sentinels for reemerging *Trypanosoma cruzi* transmission. *Preventive Veterinary Medicine* 2015; 120: 349–356. <http://dx.doi.org/10.1016/j.prevetmed.2015.04.014>

Cazorla-Perfetti DJ, Nieves-Blanco EE. Triatominos de Venezuela: aspectos taxonómicos, biológicos, distribución geográfica e importancia médica. *Avances cardiológicos*. 2010; 30(4):347-369.

Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Trypanosomiasis American. <http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/TrypanosomiasisAmerican.htm>

Cermeño JW. Infección por *Trypanosoma cruzi* en el estado bolívar, venezuela. revisión y actualización. *Saber, Universidad de Oriente, Venezuela* 2013; 25(2): 129-141.

Comisión de Ética, Bioética y Bioseguridad (CEBioBio) Normas de bioética y bioseguridad para la investigación con organismos vivos y ambiente. *Ministerio del Poder Popular para la Ciencia y la Tecnología*.2008; 22-33.

Contreras V. Elementos de Apoyo para Trabajar en Enfermedad de Chagas. 1era ed. Fondo Editorial Universidad de Carabobo. Valencia: Clemente Editores; 1994. p. 35-47.

Cover B, Gutteridge WE. The course of infection of *Trypanosoma cruzi* in irradiated rats. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*.1978; 72:596 - 601.

Crisante G, Rojas A, Teixeira M, Añez N. Infected dogs as a risk factor in the transmission of human *Trypanosoma cruzi* infection in western Venezuela. *Acta Trópica*. 2006; 98: 247–254. doi:10.1016/j.actatropica.2006.05.006

Cruz-Guzmán PJ, Morocoima A, Chique JD, Ramonis-Quintero J, Uzcátegui M, Carrasco H. *Psammolestes arthuri* naturalmente infectado con *Trypanosoma cruzi* encontrado en simpatria con *Rhodnius prolixus* y *Triatoma maculata* en nidos de aves en el estado Anzoátegui, Venezuela. *Saber*. 2014; 26(4):428-440.

D' Alessandro A, Saravia N. *Trypanosoma rangeli*. In: Lumsden WHR, Evans DA. (Eds.), *Parasitic Protozoa*. Academic Press. 1992; 1–54.

de Freitas JM, Augusto-Pinto L, Pimenta JR, Bastos-Rodrigues L, Goncalves VF, Teixeira SM, y col. Ancestral genomes, sex, and the population structure of *Trypanosoma cruzi*. *PLoS Pathogens*. 2006; 2: 226–235. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.ppat.0020024>

de Lana M , da Silviera Pinto A , Bastrenta B , Barnabé C , Noël S , Tibayrenc M. *Trypanosoma cruzi*: Infectivity of Clonal Genotype Infections in Acute and Chronic Phases in Mice. *Experimental Parasitology*. 2000; 96(2):61–66. doi:10.1006/expr.2000.4552

de Scorza C, Herrera L, Urdaneta-Morales S. *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi*: histopathology in mice infected with strains isolated from *Didelphis marsupialis* from the valley of Caracas (Venezuela). *Acta Científica Venezolana*. 1996; 47:244–247.

de Sousa MA. Morphobiological characterization of *Trypanosoma cruzi* Chagas, 1909 and its distinction from other Trypanosomes. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. 1999; 94: 205-210. <http://dx.doi.org/10.1590/S0074-02761999000700031>

Deane MP, Jansen AM, Mangia RHR, Goncalvez AM, Morel CM. Are our laboratory “strains” representative samples of *Trypanosoma cruzi* populations that circulate in nature?. *Memorias Instituto Oswaldo Cruz*. 1984; 79: 19-24.

Deane MP, Lenzi HL, Jansen AM. Double development cycle of *Trypanosoma cruzi* in the opossum. *Parasitology Today*. 1986; 2: 146-147.

Di Noia J, Buscaglia C, De Marchi C, Almeida I, Frasch A. A *Trypanosoma cruzi* small surface molecule provides the first immunological evidence that Chagas’ disease is due to a single parasite lineage. *Journal of Experimental Medicine*. 2002; 195: 401-413. doi: 10.1084/jem.20011433

Díaz-Bello Z, Zavala-Jaspe R, Reyes-Lugo M, Colmenares C, Noya-Alarcón O, Noya O, y col. Urban *Trypanosoma cruzi* Oral Transmission: from a Zoonotic Founder Focus to the Largest Microepidemic of Chagas Disease. *SOJ Microbiology & Infectious Diseases*.2016; 4(1): 1-9.

Drugs for Neglected Diseases initiative (DNDi). Chagas Disease [Internet]. 2016. <http://www.dndi.org/diseases-projects/diseases/chagas.html>

Dujardin JP, Schofield CJ, Panzera F. Los vectores de la enfermedad de Chagas. Academie Royale Des Sciences D'outre-Mer. Classe des Sciences naturelles et médicales. Mémoire in-8°, Nouvelle Série, Tome 25, fasc. 3, Bruxelles, 2002.

Eisenberg JF. Mammals of the Neotropics: The Northern Neotropics, Panama, Colombia, Venezuela, Guayana, Suriname, French Guiana. *The University of Chicago Press*. 1989; (1):1-589.

Falla A, Herrera C, Fajardo A, Montilla M, Vallejo GA, Guhl F. Haplotype identification within *Trypanosoma cruzi* I in Colombian isolates from several reservoirs, vectors and humans. *Acta Trópica*. 2009; 110:15-21. doi:10.1016/j.actatropica.2008.12.003

Feliciangeli MD, Campbell-Lendrum D, Martínez C, González D, Coleman P, Davies C Chagas disease control in Venezuela: lessons for the Andean Region and beyond. *Trends Parasitology*. 2003; 19(1): 44-49. [http://dx.doi.org/10.1016/S1471-4922\(02\)00013-2](http://dx.doi.org/10.1016/S1471-4922(02)00013-2)

Feliciangeli MD, Carrasco H, Patterson J, Suarez B, Martínez C, Medina M. 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. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 2004; 71(4):501-505.

Fernández O, Santos SS, Cupolillo E, Mendonça B, Derre R, Junqueira CV, y col. A mini-exon multiplex polymerase chain reaction to distinguish the major groups of *Trypanosoma cruzi* and *T. rangeli* in the Brazilian Amazon. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 2001; 95:97-99.

Ferreira M, Silistino-Souza R, Varella-Garcia Marileila, Azeredo-Oliveira MTV, Silva AE. Biologic and Genetics Aspects of Chagas Disease at Endemic Areas. Review. *Journal of Tropical Medicine*. 2012; 2012:1-11. <http://dx.doi.org/10.1155/2012/357948>

Ferrer E, Da Conceicao F, Campioli P, Lares M, López M, Rivera MG y col. Validación de protocolos de PCR para el diagnóstico molecular de la Enfermedad de Chagas. *Revista de la facultad de ciencias de la salud. Salus Online*. 2009; 12(1): 163-174.

Fujita O, Sanabria L, Inchausti A, De Arias AR, Tomizawa Y, Oku Y .Animal reservoirs for *Trypanosoma cruzi* infection in an endemic area in Paraguay. *The Journal of veterinary medical science*. 1994; 56(2):305-308.

Gamboa J. Ecología de la Tripanosomiasis Americana (Enfermedad de Chagas en Venezuela. *Boletín de la Dirección de Malariología y Saneamiento Ambiental*. 1974; 14: 3-20.

García R, Lozano A, Villamizar L, Ferrer E, Urdaneta S, Herrera L. Inventario de vectores y reservorios de *Trypanosoma cruzi* provenientes de la Gran Caracas, Venezuela, Laboratorio de Biología de Vectores y Parásitos, 1990-2011. *Revista Biomédica*. 2011; 31(3):285-86.

García-Alzate R, Lozano-Arias D, Reyes-Lugo RM, Morocoima A, Herrera L, Mendoza León A. *Triatoma maculata*, the vector of *Trypanosoma cruzi* in Venezuela. Phenotypic and genotypic variability as potential indicator of vector displacement into the domestic habitat. *Frontiers in Public Health*. 2014; 2 (170):1-9. [doi:10.3389/fpubh.2014.00170](https://doi.org/10.3389/fpubh.2014.00170).

García-Jordan N, Berrzbeitia M, Concepción JL, Aldana E, Caceres A, Quiñones W. Estudio entomológico de vectores transmisores de la infección por *Trypanosoma cruzi* en la población rural del estado Sucre, Venezuela. *Biomédica*. 2015; 35(2): 247-57. <http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v35i2.2390>

García-Más I, Muñoz-Araújo B, Aguirre-Inchaurbe A, Polo-Roldán I, García-Moreno A, Refoyo-Román P. Manual de laboratorio de Parasitología 2. Flagelados sanguíneos y tisulares. *Reduca* (Biología). Serie Parasitología. 2008; 1(1):7-19. ISSN:1989-3620.

Gaunt MW, Miles MA. The ecotopes and evolution of triatomine bugs (Triatominae) and their associated trypanosomes. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2000; 95 (4):557-565. <http://dx.doi.org/10.1590/S0074-02762000000400019>

Gobierno Bolivariano de Venezuela. Gobierno en línea. Venezuela. <http://gobiernoenlinea.gob.ve/home/venezuela.dot>

Gómez-Nuñez J, Fernández M. La colonia de *Rhodnius prolixus* en el Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas. *Boletín Informativo de la Dirección de Malariología Sanidad Ambiental*. 1963; 3:134-137.

Guhl F, Lazdins-Helds H. Reporte sobre la Enfermedad de Chagas. Grupo de Trabajo Científico. *World Health Organization on behalf of the Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases*. 2007.

Guimarães-Drumond JA, Marcopito LF. Internal migration and distribution of Chagas disease mortality, Brazil, 1981-1998 *Cadernos de Saúde Pública*. 2006;22(10):2131-2140. <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-311X2006001000019>

Gürtler RE, Cardinal MV. Reservoir host competence and the role of domestic and commensal hosts in the transmission of *Trypanosoma cruzi*. *Acta Tropica*. 2015; 151: 32–50. <http://dx.doi.org/10.1016/j.actatropica.2015.05.029>

Guzmán-Marín E, Zavala-Castro J, Acosta-Viana K, Rosado-Barrera M. Importancia de la caracterización de cepas de *Trypanosoma cruzi*. *Revista Biomédica*. 1999. 10(3):177-184.

Haydon D, Cleaveland S, Taylor L, Laurenson M. Identifying reservoirs of infection. A conceptual and practical challenge. *Emerging Infectious Disease*. 2002; 8(12):1468-1473. doi: [10.3201/eid0812.010317](https://doi.org/10.3201/eid0812.010317)

Herrera C, Barges MD, Fajardo A, Montilla M, Triana O, Vallejo GA, Guhl F. Identifying four *Trypanosoma cruzi* I isolate haplotypes from different geographic regions in Colombia. *Infection, genetics and evolution: journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases*. 2007; 7(4):535-539. doi: [10.1016/j.meegid.2006.12.003](https://doi.org/10.1016/j.meegid.2006.12.003)

Herrera L, das Chagas S, Viegas C, Martínez C, Cotias P, Carrasco H, y col. *Trypanosoma cruzi* in a caviomorph rodent: parasitological and pathological features of the experimental infection of *Trichomys apereoides* (Rodentia, Echimyidae). *Experimental Parasitology*. 2004; 107(1-2):78–88. doi: [10.1016/j.exppara.2004.04.008](https://doi.org/10.1016/j.exppara.2004.04.008)

Herrera L, Martínez C, Carrasco H, Jansen A, Urdaneta-Morales S. Cornea as a tissue reservoir of *Trypanosoma cruzi*. *Parasitology Research*. 2007; 100:1395-1399. doi: [10.1007/s00436-006-0403-9](https://doi.org/10.1007/s00436-006-0403-9).

Herrera L, Morocoima A, Aguilar C.M, Urdaneta-Morales S. *Trypanosoma cruzi*: parasitismo del tejido conectivo adiposo. *Revista científica FCV-LUZ*. 2005; 15 (3):210-216.

Herrera L, Urdaneta-Morales S. *Didelphis marsupialis*: a primary reservoir of *Trypanosoma cruzi* in urban areas of Caracas, Venezuela. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*. 1992; 68: 607-12.

Herrera L, Urdaneta-Morales S. Experimental transmission of *Trypanosoma cruzi* through the genitalia of albino mice. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2001; 96:713-717. <http://dx.doi.org/10.1590/S0074-02762001000500024>

Herrera L, Urdaneta-Morales S. Experimental transmission of *Trypanosoma cruzi* through the genitalia of albino mice. *Memorias Instituto Oswaldo Cruz*. 2001; 96:713-717.

Herrera L, Urdaneta-Morales S. Synanthropic rodent reservoirs of *Trypanosoma* (*Schizotrypanum*) *cruzi* in the valley of Caracas, Venezuela. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*. 1997; 39:279-282.

Herrera L. *Trypanosoma cruzi*, the causal agent of Chagas disease: boundaries between wild and domestic cycles in Venezuela. *Frontiers in Public Health*. 2014; 2(259):1-4. <http://dx.doi.org/10.3389/fpubh.2014.00259>

Herrera L. Una revisión sobre reservorios de *Trypanosoma* (*Schizotrypanum*) *cruzi* (Chagas, 1909), agente etiológico de la Enfermedad de Chagas. *Boletín de Malariología y Salud Ambiental*. 2010; 50(1):3-15.

Horwitz P, Wilcox BA. Parasites, ecosystems and sustainability: an ecological and complex systems perspective. *International journal for parasitology*. 2005; 35(7): 725-732. doi:10.1016/j.ijpara.2005.03.002

Instituto nacional de estadística (INE). Anuario Estadístico de Venezuela. 2013; 973. <http://www.ine.gov.ve/documentos/AspectosFisicos/DivisionpoliticoTerritorial/pdf/DPTconFinesEstadisticosOperativa2013.pdf>

Jansen AM, Santos de Pinho AP, Lisboa CV, Cupolillo E, Mangia RH, Fernandes O. The sylvatic cycle of *Trypanosoma cruzi*: a still unsolved puzzle. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. 1999; 94(1): 203-204.

Jansen AM, Xavier S, Roque AL. The multiple and complex and changeable scenarios of the *Trypanosoma cruzi* transmission cycle in the sylvatic environment. *Acta Tropica*. 2015; 151: 1-15. doi: 10.1016/j.actatropica.2015.07.018.

Lent H, Wygodzinsky P. Revision of the Triatominae (Hemiptera, Reduviidae) and their significance as vectors of Chagas disease. *Bulletin of the American Museum of Natural History*. 1979; 163: 123-520.

Lenzi H, Oliveira D, Lima M, Gattass C. *Trypanosoma cruzi*: paninfectivity of CL strain during murine acute infection. *Experimental Parasitology*. 1996; 84:16-27.

Levy MZ, Tustin A, Castillo-Neyra R, Mabud TS, Levy K, Barbu CM y col. Bottlenecks in domestic animal populations can facilitate the emergence of *Trypanosoma cruzi*, the aetiological agent of Chagas disease. *Proceedings Biological Sciences*. 2015; 282 (1810): 20142807. doi: 10.1098/rspb.2014.2807

Lewis MD, Ma J, Yeo M, Carrasco HJ, Llewellyn MS, Miles MA. Genotyping of *Trypanosoma cruzi*: Systematic Selection of Assays Allowing Rapid and Accurate Discrimination of All Known Lineages. *American Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 2009; 81: 1041-1049.

Lisboa CV, Pinho AP, Monteiro RV, Jansen AM. *Trypanosoma cruzi* (kinetoplastida Trypanosomatidae): Biological heterogeneity in the isolates derived from wild hosts. *Experimental Parasitology*. 2007; 116 (2): 150-155. doi:10.1016/j.exppara.2006.12.005

Macedo A, Pena S. Genetic variability of *Trypanosoma cruzi*: implications for the pathogenesis of Chagas disease. *Parasitology Today*. 1998. 14(3): 119-24. [http://dx.doi.org/10.1016/S0169-4758\(97\)01179-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0169-4758(97)01179-4)

Macedo AM, Oliveira RP, Pena S. Chagas disease: role of parasite genetic variation in pathogenesis. *Expert reviews in molecular medicine*. 2002; 4(5):1-16 doi:10.1017/S1462399402004118.

Magalhães-Santos IF, Souza MM, Lima CSC, Andrade SG. Infection of *Calomys callosus* (Rodentia, Cricetidae) with strains of different *Trypanosoma cruzi* biotopes: pathogenicity, histotropism, and fibrosis induction. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2004; 99(4): 407-413. <http://dx.doi.org/10.1590/S0074-02762004000400011>.

Martins K, Andrade C, Barbosa-Silva AN, do Nascimento GB, Chiari E, Galvao LM, Camara A. *Trypanosoma cruzi* III causing the indeterminate form of Chagas disease in a semi-arid region of Brazil. *International Journal of Infectious Diseases*. 2015; 39: 68-75. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijid.2015.08.012>.

Melnikov V, Fierro F, Espinoza F, Guzman F, Dobrovinskaya O. Pathologic changes in lungs caused by mexican isolates of *Trypanosoma cruzi* in the acute phase of infection in mice. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 2005;73(2): 301-306.

Miles MA, Cedillos RA, Povia MM, Souza AA, de Prata A, Macedo V. Do radically dissimilar *Trypanosoma cruzi* strains (zymodemes) cause Venezuelan and Brazilian form Chagas' disease?. *The Lancet* 1981; 1(8284):1338-1340.

Miles MA, Feliciangeli MD, de Arias AR. American trypanosomiasis (Chagas disease) and the role of molecular epidemiology in guiding control strategies. *British Medical Journal*. 2003; 326(7404):1444-8. doi: 10.1136/bmj.326.7404.1444

Moncayo A. Chagas disease: Current epidemiological trends after the interruption of vectorial and transfusional transmission in the Southern Cone countries. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2003; 98(5):577-591. <http://dx.doi.org/10.1590/S0074-02762003000500001>

Monteiro WM, Costa-Magalhaes LK, Costa-Oliveira J, Guerra J, Silveira H, de Lima-Ferreira LC y col. Biological behavior of *Trypanosoma cruzi* stocks obtained from the State of Amazonas, Western Brazilian Amazon, in mice. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 2012; 145(2):209-214. doi: 10.1590/S0037-86822012000200014

Moreno E, González N, Rivera I, Guillén B, Lugo A, Añez N. Caracterización biológica e isoenzimática de aislados de *Trypanosoma cruzi*. *Boletín de malariología y saneamiento ambiental*. 2002; 42 (1-2): 17-28.

Morocoima A, Carrasco HJ, Boadas J, Chique JD, Herrera L, Urdaneta-Morales S. *Trypanosoma cruzi* III from armadillos (*Dasypus novemcinctus novemcinctus*) from Northeastern Venezuela and its biological behavior in murine model. Risk of emergency of Chagas' disease. *Experimental Parasitology*. 2012; 132:341–347. doi: 10.1016/j.exppara.2012.08.008

Morocoima A, Chique J, Herrera L, Urdaneta-Morales S. *Eratyrus mucronatus* (Stal, 1859) (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae): primer registro para el estado Anzoátegui (Venezuela). *Boletín de Malariología y Salud Ambiental*. 2010b; 48(2): 307-310.

Morocoima A, Chique J, Zavala-Jaspe R, Díaz-Bello Z, Ferrer E, Urdaneta-Morales S, Herrera L. Commercial coconut palm as an ecotope of Chagas disease vectors in north-eastern Venezuela. *Journal of Vector Borne Disease*. 2010a; 47: 76-84.

Morocoima A, De Sousa L, Herrera L, Roja s L, Villalobos M, Chique J, Barroyeta R, Bónoli S. Simpatria de triatominos (Reduviidae) y escorpiones (Buthidae) en *Coco nucifera* y *Acrocomia aculeata* (Araceae) de Anzoátegui, Venezuela. *Boletín de malariología y salud ambiental*. 2011; 51(2):187-198.

Morocoima A, Tineo E, Ferrer E, Herrera L, Nuñez M. Enfermedad de Chagas en el estado Anzoátegui, Venezuela: Registro de un caso agudo y caracterización parasitológica y molecular del aislado. *Boletín de malariología y salud ambiental*. 2008; 48 (2): 121-126.

Nai GA, Ferro L, Galle LC, Quatrochi PJ, Giroto LA. Procedimentos de coloração dos preparados cito e histológicos uma nova proposta. *Laes & Haes*. 2004; 147; 123–128

Noireau F, Flores R, Vargas F. Trapping sylvatic Triatominae (Reduviidae) in hollow trees. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 1999; 99:13-4

Noya-Alarcón O, Botto C, Cortez J, Ferrer E, Viettri M, Herrera L. Primer registro de *Panstrongylus geniculatus* (Latreille, 1811) en los municipios Alto Orinoco y Atures, estado Amazonas, Venezuela. *Boletín de malariología y salud ambiental*. 2011; 51 (1): 81-85.

Noireau F, Diosque P, Jansen AM. *Trypanosoma cruzi*: adaptation to its vectors and its hosts. *Veterinary Research*. 2009; (40): 26-46. <http://dx.doi.org/10.1051/vetres/2009009>

Otero M, Jiménez J, Carcavallo R, Ortega R, Tonn R. 1975. Actualización de la distribución geográfica de Triatominae (Hemiptera, Reduviidae) en Venezuela. *Boletín de malariología y salud ambiental*. 1975.15(5):217- 230.

Patterson JS, Guhl F. Geographical Distribution of Chagas Disease, Capítulo 5. En: Telleria, J. y Tibayrenc, M. American Trypanosomiasis Chagas Disease. One Hundred Years of Research. *El Sevier*. First edition. 2010; pp 54-123

Pavlovsky EN. Natural nidity of transmissible diseases with special reference to the landscape epidemiology of zoonanthroposes. *University of Illinois Press*, Urbana USA. 1966: 1-291.

Perlowagora-Szumlewicz A, Moreira JC. In vivo differentiation of *Trypanosoma cruzi*. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. 1994; 89(4): 603-618. <http://dx.doi.org/10.1590/S0074-02761994000400018>.

Pérttega S, Pita S. Significancia estadística y relevancia clínica, *Cadernos de Atención Primaria*. 2001; 8: 191-195. https://www.fisterra.com/mbe/investiga/signi_estadi/signi_estadi.asp

Pickenhayn J, Borges R, do Carmo S, Curto S. Processo de urbanização da doença de chagas na argentina e no Brasil urbanization process of Chagas diseases in Argentina and Brazil. *Revista Brasileira de Geografia Médica e da Saúde, Hygeia*. 2008; 4:58-69.

Pífano F. El potencial enzoótico silvestre del complejo ecológico *Schizotrypanum cruzi-Didelphis marsupialis- Panstrongylus geniculatus* y sus incursiones a la vivienda humana del valle de Caracas, Venezuela. *Boletín de la Academia de Ciencias, Físicas, Matemáticas y Naturales*. 1986; 46:9-37.

Pinchin R, Fanara DM, Castleton CW, Oliveira Filho AM. Comparison of techniques for detection of domestic infestations with *Triatoma infestans* in Brazil. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*.1981; 75(5):691-694. [doi:10.1016/0035-9203\(81\)90150-4](https://doi.org/10.1016/0035-9203(81)90150-4).

Pizzi T, Wallace A, Villagra R, Muñoz S, Ortiz S, Solari A. Concordancia de lesiones histológicas en ratones infectados por dos poblaciones de *Trypanosoma cruzi* de Chile. *Revista Médica de Chile*. 2005; 133: 432-438. <http://dx.doi.org/10.4067/S0034-98872005000400006>.

Ramsey JM, Gutiérrez-Cabrera AE, Salgado-Ramírez L, Peterson AT, Sánchez-Cordero V, Ibarra-Cerden CN. Ecological Connectivity of *Trypanosoma cruzi* Reservoirs and *Triatoma pallidipennis* Hosts in an Anthropogenic Landscape with Endemic Chagas Disease. *PLoS ONE*. 2012; 7(9): e46013. [doi:10.1371/journal.pone.0046013](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0046013).

Reyes-Lugo M, Reyes-Contreras M, Salvi I, Gelves W, Avilán A, Llavaneras D, y col. The association of *Triatoma maculata* (Ericsson 1848) with the gecko *Thecadactylus rapicauda* (Houttuyn 1782) (Reptilia: Squamata: Gekkonidae): A strategy of domiciliation of the Chagas disease peridomestic vector in Venezuela?.*Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. 2011; 1(4): 279-284. [doi: 10.1016/S2221-1691\(11\)60043-9](https://doi.org/10.1016/S2221-1691(11)60043-9).

Reyes-Lugo M, Rodriguez-Acosta A. Domiciliation of the sylvatic Chagas disease vector *Panstrongylus geniculatus* Latreille, 1811 (Triatominae: Reduviidae) in Venezuela. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 2000; 94(5):508. [doi: 10.1016/S0035-9203\(00\)90068-3](https://doi.org/10.1016/S0035-9203(00)90068-3)

Reyes-Lugo M. *Panstrongylus geniculatus* Latreille 1811 (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae), vector de la enfermedad de Chagas en el ambiente domiciliario del centro-norte de Venezuela. *Revista Biomed*. 2009; 20: 180-205.

Rimoldi A, Alves RT, Ambrósio DL, Fernandes MZT, Martinez I, Freitas de Araújo R, y col. Morphological, biological and molecular characterization of three strains of *Trypanosoma cruzi* Chagas, 1909 (Kinetoplastida, Trypanosomatidae) isolated from *Triatoma sordida* (Stal) 1859 (Hemiptera, Reduviidae) and a domestic cat. *Parasitology*. 2012; 139: 37-44. doi: 10.1017/S0031182011001697.

Rivera IM, Moreno EA, González N, Lugo A. Caracterización de aislados de *Trypanosoma cruzi* del occidente de Venezuela. *Revista de Ecología Latino Americana*. 2000; 7(3): 1-10.

Rivera MG, Herrera L, Morocoima A, Aguilar CM, Gárate T, López M y col. Genetic variability of *Trypanosoma cruzi* TcI isolates from rural and urban areas of Venezuela. *Journal of Vector Borne Diseases*. 2015; 52: 23-29.

Rojas ME, Várquez P, Villarreal MF, Velandia C, Vergara L, Morán-Borges YH, y col. Estudio seroepidemiológico y entomológico sobre la enfermedad de Chagas en un área infestada por *Triatoma maculata* (Erichson 1848) en el centro-occidente de Venezuela. *Cadernos Saúde Pública*. 2008; 24(10):2323-2333.

Romaña CA, Pizarro JC, Rodas E, Guilbert E. Palm trees as ecological indicators of risk areas for Chagas disease. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 1999; 93(6): 594-595. doi:10.1016/S0035-9203(99)90059-7

Sambrook J, Russell D. Molecular Cloning. A Laboratory manual. Tercera Edición. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, New York. 2001.

Sampson-Ward L, Urdaneta-Morales S. Urban *Trypanosoma cruzi*: Biological characterization of isolates from *Panstrongylus geniculatus*. *Annales de la Société Belge de Medecine Tropicale*. 1988; 68(2): 95-106.

Sánchez J, Lew. Listado de los Mamíferos de Venezuela. Sistema de Información de Museos y Colecciones de Venezuela [en línea]. En: SIMCOZ 2010. <http://www.simcoz.org.ve>.

Schofield CJ, Dias JCP. The Southern Cone Initiative against Chagas disease. *Advances in Parasitology*. 1998; 42: 1-27. doi:10.1016/S0065-308X(08)60147-5

Schofield CJ, Galvao C. Classification, evolution and species groups within the Triatominae. *Acta Trópica*. 2009; 110(2-3): 88-100. doi:10.1016/j.actatropica.2009.01.010

Schumins GA. Epidemiology of Chagas disease in non-endemic countries: the role of international migration. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2007; 102(1): 75-85.

Schweigmann NJ, Pietrokovsky S, Bottazzi V, Conti O, Bujas MA, Wisnivesky-Colli C. Estudio de la prevalencia de la infección por *Trypanosoma cruzi* en zarigüeyas (*Didelphis albiventris*) en Santiago del Estero, Argentina. *Revista Panamericana de Salud Pública*. 1999; 6 (6): 371-376.

Shannon R. Methods for collecting and feeding mosquitos in jungle yellow fever studies. *American Journal of Tropical Medicine*. 1939; 19: 131-148.

Soto-Vivas A. Clave pictórica triatominos (Hemiptera: Triatominae) de Venezuela. *Boletín de Malariología y Salud Ambiental*. 2009; 49(2): 259-274.

Souto RP, Fernandes O, Macedo AM, Campbel DA, Zingales B. DNA markers define two major phylogenetic lineages of *Trypanosoma cruzi*. *Molecular and Biochemical Parasitology*. 1996; 83:141-152. doi:10.1016/S0166-6851(96)02755-7.

Suarez N, Cabrerías R, Cartagena L, Ayaqui R. Características biológicas de una cepa de *Trypanosoma cruzi* en un modelo murino y análisis de supervivencia. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Publica*. 2009; 26(2): 187-92,

Tarleton RL, Reithinger, R, Urbina JA, Kitron U, Gürtler RE. The Challenges of Chagas Disease-Grim Outlook or Glimmer of Hope? *PLoS Medicine*. 2007; 4(12): e332. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pmed.0040332>

Teixeira A, Nascimento RJ, Sturm NR. Evolution and pathology in Chagas disease - A Review. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2006; 101 (5): 463-491. <http://dx.doi.org/10.1590/S0074-02762006000500001>

Tejera E. La Trypanosomose americaine ou maladie de Chagas au Venezuela. *Bulletin de la Société de pathologie exotique*. 1919; 12: 509-513.

Telleria J, Tibayrenc M. American Trypanosomiasis Chagas Disease One Hundred Years of Research. *Elsevier*. 2010; 5: pp 848. ISBN: 978-0-12-384876-5

Tibayrenc M. Genetic subdivisions within *Trypanosoma cruzi* (discrete typing units) and their relevance for molecular epidemiology and experimental evolution. *Kinetoplastid Biological and Disease*. 2003; 2(12): 1-6. [doi: 10.1186/1475-9292-2-12](http://dx.doi.org/10.1186/1475-9292-2-12)

Tibayrenc M. Population genetics of parasitic protozoa and other microorganisms. *Advances in Parasitology*. 1995; 36: 47-115. [doi:10.1016/S0065-308X\(08\)60490-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0065-308X(08)60490-X)

Tyler KM, Engman DM. The life cycle of *Trypanosoma cruzi* revisited. *International Journal for Parasitology*. 2001; 31(5-6):472-481. [doi:10.1016/S0020-7519\(01\)00153-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0020-7519(01)00153-9)

Urdaneta-Morales S, McLure I. Experimental infections in Venezuelan lizards by *Trypanosoma cruzi*. *Acta Tropica*. 1981; 38: 99-105.

Urdaneta-Morales S, Nironi I. *Trypanosoma cruzi* in the anal glands of urban opossums. I- Isolation and experimental infections. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* z. 1996; 91(4):399-403.

Urdaneta-Morales S. Chagas' disease: an emergent urban zoonosis. The Caracas Valley (Venezuela) as an epidemiological model. *Frontiers in public health*. 2014 2(265): 1-13. [doi: 10.3389/fpubh.2014.00265](http://dx.doi.org/10.3389/fpubh.2014.00265)

Urdaneta-Morales S. Pleomorfism in trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi* from blood and cell culture. *Tropenmedizin und Parasitologie*. 1983; 34(4):225-228.

Vallejo GA, Guhl F, Schaub GA. Triatominae-*Trypanosoma cruzi*/T. rangeli: Vector-parasite interactions. *Acta Tropica*. 2009; 110(2-3):137-147. [doi:10.1016/j.actatropica.2008.10.001](http://dx.doi.org/10.1016/j.actatropica.2008.10.001)

Vergel M, Urdaneta-Morales S. Importancia de la especie del mamífero en la infección experimental por *Trypanosoma cruzi*. *Revista de la facultad de ciencias de la salud. Salus*. 2007; 11 (1): 15-19.

Watkins R. 1966. Comparison of infection produced by two strains of *Trypanosoma cruzi* in mice. *J. Parasitol*. 52:958-961.

Westenberger SJ, Barnabe C, Campbell DA, Sturm NR. Two hybridization events define the population structure of *Trypanosoma cruzi*. *Genetics*, 2005; 171(2): 527-543. [doi: 10.1534/genetics.104.038745](http://dx.doi.org/10.1534/genetics.104.038745)

Wincker P, Britto C, Pereira JB, Cardoso MA, Oelemann W, Morel CM. Use of a simplified polymerase chain reaction procedure to detect *Trypanosoma cruzi* in blood samples from chronic chagasic patients in a rural endemic area. *The American Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 1994; 51(6): 771-777.

World Health Organization (WHO). Chagas disease (American Trypanosomiasis). 2016. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/index.html>. Acceso: 15 abril 2016.

World Health Organization (WHO). Tropical disease Research. Fifteenth Programme. Report. Progress (1999-2000). Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases (TDR). Geneva. 2001; <http://www.who.int/tdr>

Yauri V, Castro-Sesquen YE, Verastegui M, Angulo N, Reciencho F, Cabello I y col., Domestic Pig (*Sus scrofa*) as an animal model for experimental *Trypanosoma cruzi* infection. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 2016; 94(5): 1020-1027. doi: [10.4269/ajtmh.15-0233](https://doi.org/10.4269/ajtmh.15-0233).

Zeledón R. Epidemiology, modes of transmission and reservoir hosts of Chagas' disease. En: *Trypanosomiasis and Leishmaniasis with special reference to Chagas disease*, Ciba Found Symp 20. *El Sevier, New York* . 1974; pp 51-85.

Zingales B, Andrade SG, Briones MRS, Campbell DA, Chiari E, Fernandes O, y col. A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2009; 104(7):1051-1054. doi: [10.1590/S0074-02762009000700021](https://doi.org/10.1590/S0074-02762009000700021)

Zingales B, Souto RP, Mangia RH, Lisboa CV, Campbell DA, Coura JR, Fernandes O. Molecular epidemiology of American Trypanosomiasis in Brazil based on dimorphism of rRNA and mini-exón gene sequences. *International Journal for Parasitology*. 1998; 28(1):105-112.

Zingales B, Stolf BS, Souto RP, Fernandes O, Briones MRS. Epidemiology, biochemistry and evolution of *Trypanosoma cruzi* lineages based on ribosomal RNA sequences. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. 1999; 94(1): 159-164.

Zingales B, Miles MA, Campbell DA, Tibayrenc M, Macedo AM, Teixeira MMG, y col. The revised *Trypanosoma cruzi* subspecific nomenclature: Rationale, epidemiological relevance and research applications. *Infection, Genetics and Evolution*. 2012; 12(2): 240–253. doi: [10.1016/j.meegid.2011.12.009](https://doi.org/10.1016/j.meegid.2011.12.009).

Zingales B. *Trypanosoma cruzi*: um parasita, dois parasitas ou vários parasitas da doença de Chagas?. *Revista da Biologia*. 2011; 6b:44-48. doi:[10.7594/revbio.6b.09](https://doi.org/10.7594/revbio.6b.09)

12. ANEXOS

Anexo 1.



Proyecto Estratégico: Evaluación y mejoramiento de la viviendas rurales y suburbanas con participación comunitaria para el control y la prevención de la enfermedad de Chagas en Venezuela UCV-UC-UDO FONACIT N° 2011000470

CONSENTIMIENTO INFORMADO

Información para jefes(as) de familia y familias participantes:

El ministerio del Poder Popular para la ciencia y tecnología y las Universidades Central de Venezuela, de Carabobo y de Oriente, estamos trabajando en un estudio sobre chipos, jipitos o pitos, insectos transmisores de la Enfermedad de Chagas. Dicho trabajo es sin fines de lucro ni compromisos económicos.

Queremos solicitarle su participación como jefe de familia, por lo que es importante que usted lea la siguiente información, para que comprenda las razones de dicho estudio.

La Enfermedad de Chagas es producida por un parásito microscópico llamado *Trypanosoma cruzi*, que entra al cuerpo por las heces de los chipos que se alimentan de sangre y que entran en contacto con la piel, la boca, alimentos expuestos a la intemperie o contaminados con dichas heces. Cuando las personas son infectadas pueden presentar picadas con enrojecimiento e hinchazón, y se pueden enfermar presentando fiebre alta por varios días, dolor de huesos, ojos o cara hinchadas, piernas o cuerpo hinchados, malestar general, vómitos, dolor abdominal.

Este chipo puede vivir en cuevas o grietas, en camas, catres y hamacas en las casas o en sus alrededores, y salen de noche atraídos por la luz y el calor de las personas y animales para picar y alimentarse de sangre. Nuestro trabajo es encontrarlos dentro de las viviendas y sus alrededores, usando a veces un aspirador eléctrico para capturarlos.

Por todo ello solicitamos respetuosamente su permiso y colaboración para: -hacerle un cuestionario de preguntas acerca de usted, su familia, su vivienda, y otras que tienen que ver con el chipo y la Enfermedad de Chagas, - realizar una búsqueda del chipo dentro y alrededor de su vivienda, llevando un aspirador eléctrico, mangueras, bolsas y demás implementos necesarios para la realización del trabajo, - tomar fotografías o videos si es necesario.

Siempre el jefe de familia o quien él decida nos acompañara por la visita, para mover muebles, enceres u otros objetos, los cuales serán ordenados nuevamente, se recolectaran en bolsas el material aspirado y se analizara en laboratorio buscando al chipo o restos de estos. Si se encuentran estos insectos y estuviesen positivos al parásito será informado a la brevedad que permitan las pruebas y se realizaran posteriormente actividades de ordenamiento de la vivienda control de insectos y de animales reservorios en las cuales y aspiramos Ud. se integre al equipo de trabajo durante la planificación e implementación de las mismas, de manera que pueda protegerse.

El beneficio que usted y su familia obtendrá es el conocimiento acerca de la enfermedad y en caso de síntomas sospechosos será referido para exámenes diagnósticos en la Universidad de Oriente y/o La universidad de Carabobo, y se harán las diligencias para conducirlo al tratamiento adecuado. Su participación y el de su familia será completamente voluntaria sin pago alguno y usted puede retirarse en cualquier momento si así lo decide, sin que esto afecte alguna atención de Ud. en laboratorio alguno de entes de salud pública o de las Universidades participantes, cuando lo necesite.

Los resultados de los estudios de laboratorio son estrictamente confidenciales serán resguardados por el responsable del Proyecto y sus investigadores corresponsables, y serán presentados a Ud. oportunamente y su posterior uso será estrictamente parte de los informes y productos remitidos al FONACIT, Ministerio del Poder Popular para La Salud y a los Consejos Comunales a los que Ud. pertenezca.

Leído y escuchado la información sobre el estudio que los investigadores están realizando, y confirmo que comprendo de qué se trata, que entiendo que es un estudio sobre los Chipos que transmite el parásito que produce la Enfermedad de Chagas, que entiendo buscara al chipo dentro o fuera de mi domicilio por revisión de la vivienda, utilización de aspiradoras y que a estos insectos se le realizaran pruebas de laboratorio para ver si tienen el parásito que produce el “Mal de Chagas”.

Entiendo que este estudio será en beneficio de mi persona y de mis familiares, que conoceremos mejor como se presenta la enfermedad y como se transmite, sabremos cómo prevenirla como se harán las mejoras de la vivienda y la aplicación de insecticida en mi hogar si encuentran chipos o restos de estos.

Participo en este estudio por voluntad propia y autorizo a realizar la búsqueda de chipos en mi vivienda y sus alrededores por los métodos explicados previamente. Así mismo entiendo que tengo el derecho, con o sin razón expresa, de retirarme del estudio en cualquier momento sin que esto afecte, o me niegue el acceso a servicios de salud.

NOMBRE

Nombre de testigo

Huella:

En _____ a los _____ días del mes de _____ de 201__

DATOS DE CAPTURA DE MAMIFEROS

FECHA: _____

ESTADO: _____ MUNICIPIO: _____

SECTOR: _____ PARROQUIA: _____

COORDENADAS:

N° de registro: _____ Longitud: _____ Latitud: _____

Altura sobre el nivel del mar: _____ Hora: _____

Trampa N°: _____ Método de Captura: _____

Cebo utilizado: _____

Tipo de trampeo utilizado en la captura: _____

Especimen capturado: Género: _____ Especie: _____

Sexo: _____ Estado de desarrollo: Juvenil: _____ Adulto: _____

Condición corporal: _____ Peso: _____

Medidas corporales (cm):

Cabeza-Base cola (lcc): _____ Longitud cola (lc): _____ Oreja (lo): _____

Pata Delantera (Derecha): _____ Pata Trasera (Derecha): _____

Patas con garras: Si _____ No: _____ Peso: _____ Fotografía N°: _____

Código o número de Marcaje: _____

Análisis Realizados:

Xenodiagnóstico: _____ Suero papel filtro: _____ Punción cardiaca: _____

Gota fresca: Si: _____ No: _____ Resultado: Parásitos circulantes: No: _____ Si: _____

Cantidad de parásitos: _____ Hora de liberación: _____

Especimen sobrevivió: Si _____ No: _____ Hora de muerte: _____

Nombre del Investigador que procesa al espécimen: _____

Observaciones: _____

Anexo 3. Valores promedio y desviación estándar de los parámetros de cinética de infección evaluados en modelo murino NMRI de los aislados de *Trypanosoma cruzi* obtenidos de triatomíneos y mamíferos de las regiones Oriental y Centro-Occidental de Venezuela.

Hospedador	RG	N° M	N +	% +	N° IN	PP (días)	PIP (días)	MP (Flagxmx10 ⁴)	%M
Triatomíneos	ORT	133	83	62	14	15 ± 6,6	17 ± 12,2	29,04 ± 37,7	60 ± 37,4
	CO	72	51	71	24	13 ± 4,0	19 ± 14,2	19,30 ± 34,0	74 ± 31,1
	Total	205	134	67	38	14 ± 5,3	18 ± 13,2	24,17 ± 35,9	67 ± 34,3
Mamíferos	ORT	83	36	43	13	14 ± 5,9	21 ± 9,4	9,39 ± 8,5	74 ± 36,4
	CO	172	51	30	10	15 ± 4,9	19 ± 12,2	4,61 ± 4,5	63 ± 42,9
	Total	255	87	37	34	15 ± 5,4	20 ± 10,8	7,00 ± 6,5	69 ± 39,7
Total	ORT	216	119	55	27	15 ± 6,3	19 ± 10,8	19,22 ± 23,1	67 ± 36,9
	CO	244	102	42	34	14 ± 4,5	19 ± 13,2	11,96 ± 19,3	69 ± 37,0
	Total	460	221	49	61	15 ± 5,4	19 ± 12,0	15,59 ± 21,2	68 ± 36,9

RG: región geográfica; ORT: oriental; CO: Centro-occidental; N°M: número de hospedadores muestreados; N+: número de hospedadores positivos para *T. cruzi*; N° IN: número de aislados inoculados; %+: porcentaje de positividad al parásito; PP: periodo prepatente; PIP: periodo infección patente; MP: máxima parasitemia; %M: porcentaje de mortalidad.

Anexo 4. Comparación estadística de los parámetros de la cinética de infección de los aislados de *Trypanosoma cruzi* obtenidos de triatomíneos y mamíferos en las regiones Oriental y Centro-Occidental de Venezuela.

Parámetros	Triatomíneos Oriental/Centro-Occidental			Mamíferos Oriental/Centro-Occidental			Triatomíneos- Mamíferos Oriental			Triatomíneos- Mamíferos Centro-Occidental		
	T-test p	F-test p	K-S p	T-test p	F-test p	K-S p	T-test p	F-test p	K-S p	T-test p	F-test p	K-S p
PP	0,406	0,040	0,788	0,699	0,604	0,924	0,724	0,696	0,993	0,309	0,473	0,488
PIP	0,730	0,535	0,788	0,637	0,388	0,638	0,366	0,380	0,131	0,850	0,627	0,992
MP	0,418	0,648	0,327	0,121	0,069	0,214	0,078	8,23 E-6	0,303	0,054	4,46 E-7	0,173
%M	0,218	0,421	0,263	0,512	0,584	0,881	0,306	0,931	0,665	0,294	0,162	0,256

PP: periodo prepatente; PIP: Periodo de infección patente; MP: máxima parasitemia; %M: porcentaje de mortalidad; T-test: Test de igualdad de medias; F-test: Test de igualdad de varianzas; K-S: Test de igualdad de distribuciones de Kolmogorov-Somirnov. p>0,05: diferencias no significativas; p<0,005: diferencias significativas.