



Universidad Central de Venezuela
Facultad de Ciencias
Escuela de Biología

Comportamiento biológico del aislado venezolano AM-16 de
Trypanosoma cruzi: estudio de la colonización de la mucosa bucal y
gástrica en el modelo murino.

TRABAJO ESPECIAL DE GRADO

Presentado ante la ilustre
Universidad Central de Venezuela por la:
Br. Jeniree Sagasti Sánchez
como requisito para optar por el título de
Licenciado en Biología.

Tutora: Dra. Cristina Sanoja W.

CARACAS, VENEZUELA

Mayo, 2017

ACTA

Quienes suscriben, miembros del jurado designado por el Consejo de la Escuela de Biología de la Facultad de Ciencias de la Universidad Central de Venezuela para examinar el Trabajo Especial de Grado titulado "**Comportamiento biológico del aislado venezolano AM-16 de *Trypanosoma cruzi*: estudio de la colonización de la mucosa bucal y gástrica en el modelo murino**", presentado por el Br. **Jeniree Sagasti Sánchez**, titular de la Cédula de Identidad no. 19.310.771, a los fines de cumplir con el requisito para optar al título de Licenciado en Biología, consideramos que este trabajo cumple con los requisitos exigidos por esta Casa de Estudios y es aprobado en nombre de la Universidad Central de Venezuela por el Jurado examinador, abajo firmantes, en la ciudad de Caracas a los 24 días del mes de Mayo de 2017.



Cristina Sanoja W.

C.I: 6.562.538

TUTOR (UCV)



Gilberto Payares Trujillo

C.I: 2.952.727

JURADO (UCV)



Anaibeth Nessi

C.I: 6.253.859

JURADO (UCV)

AGRADECIMIENTOS

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

Sin duda un especial agradecimiento a la Dra. Cristina Sanoja por darme la oportunidad de realizar este trabajo en su laboratorio, por transmitirme sus conocimientos, y especialmente agradecerle por su incondicional dedicación, apoyo y compromiso.

Mi agradecimiento al Dr. Gilberto Payares, por su disposición siempre a enseñar y transmitirme sus conocimientos y experiencias.

Quiero agradecerle a tanto a la Dra. María Lorena Márquez como a la Dra. Elizabeth Merentes del Laboratorio de Cultivo de Tejidos y Biología de Tumores, por brindarme los conocimientos necesarios para el procesamiento de muestras histológicas, y por sus consejos tan oportunos.

Muy agradecida con las Dra. Mariana Eleizalde y la Dra. Marta Mendoza, del Laboratorio de Biología de Parásitos de la UNESR-IDECYT por darme las herramientas necesarias para llevar a cabo en su laboratorio los estudios moleculares presentados en este trabajo, también por su ayuda y la confianza brindada desde el inicio.

A la Dra. Nereida Parra, del IVIC, quien amablemente nos cedió los cebadores para realizar la caracterización genética del aislado venezolano estudiado.

A mi esposo, Ricardo Salinas Mago por su apoyo incondicional, por su compañía, por ser mi confidente y por siempre creer en mí.

Gracias a mis padres, a mi hermana y mi familia cercana por demostrarme su amor, su apoyo y darme consejos.

ÍNDICE DE CONTENIDO

RESUMEN

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. La enfermedad de Chagas	1
1.2. <i>Trypanosoma cruzi</i> agente etiológico de la enfermedad de Chagas	3
1.3. Ciclo de vida de <i>Trypanosoma cruzi</i>	4
1.4. Mecanismos de transmisión de la enfermedad de Chagas	6
1.5. Fases de la enfermedad de Chagas	8
1.5.1. Fase aguda	8
1.5.2. Fase crónica	10
1.6. Métodos para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas	11
1.7. La mucosa bucal y gástrica como puerta de entrada de <i>T. cruzi</i>	12
2. ANTECEDENTES	15
3. OBJETIVOS	22
3.1. Objetivo general	22
3.2. Objetivos específicos	22
4. MATERIALES Y MÉTODOS	23
4.1. Material biológico	23
4.2. Establecimiento del ciclo experimental del parásito <i>T. cruzi</i> aislado AM-16	23
4.2.1. Evaluación parasitológica de <i>Panstrongylus</i> sp. y transmisión de la infección a ratones NMRI	23
4.2.2. Mantenimiento de <i>T. cruzi</i> AM-16 en ratones NMRI mediante pases ratón-ratón: períodos prepatente, patente y subpatente	24
4.2.3. Mantenimiento de <i>T. cruzi</i> AM-16 en <i>Rhodnius prolixus</i> : xenodiagnóstico	25

4.3. Caracterización genética del aislado AM-16 de <i>Trypanosoma</i> sp.	26
4.3.1. Obtención de las muestras	26
4.3.2. Aislamiento del ADN total	26
4.3.3 Determinación de la concentración de ADN	26
4.3.4. Amplificación de ADN	26
4.4. Estudio del comportamiento parasitológico del aislado AM-16 de <i>T. cruzi</i> en ratones NMRI	28
4.4.1. Infección experimental por vía oral: mucosa bucal	29
4.4.2. Infección experimental de los ratones por vía oral: mucosa gástrica	30
4.4.3. Infección experimental de los ratones por vía intraperitoneal	30
4.4.4. Evaluación parasitológica de los ratones infectados por las distintas vías de inoculación	30
4.4.5 Evaluación de la parasitemia.	31
4.4.6. Cuantificación de tripomastigotes en la cavidad abdominal de los ratones durante la fase aguda.	31
4.4.7. Determinación de la presencia de parásitos en sangre mediante el método del hematocrito	32
4.4.8. Coloración de las muestras por el método de Giemsa	32
4.5. Evaluación histológica de la mucosa bucal y gástrica de ratones NMRI infectados con <i>Trypanosoma cruzi</i> AM-16 por vía oral-mucosa bucal.	33

4.6. Análisis estadístico_____	35
5. RESULTADOS _____	36
5.1. Evaluación parasitológica del insecto triatomino <i>Panstongylus</i> sp. capturado en el sector Santa Ana, El Cafetal, Caracas_____	37
5.2. Establecimiento del ciclo experimental de <i>T. cruzi</i> AM-16 en el modelo ratón NMRI- <i>Rhodnius prolixus</i> y caracterización parasitológica del aislado_____	38
5.2.2. Mantenimiento del aislado AM-16 mediante pases ratón-ratón._____	38
5.2.3. Mantenimiento de <i>T. cruzi</i> aislado AM-16 en <i>Rhodnius prolixus</i> : xenodiagnóstico_____	40
5.3. Diagnóstico molecular del aislado AM-16 en el taxón especie <i>Trypanosoma cruzi</i> _____	41
5.4. Evaluación parasitológica del efecto de la vía de inoculación de <i>Trypanosoma cruzi</i> AM-16 en ratones NMRI_____	43
5.4.1. Evaluación de la sobrevivencia._____	44
5.4.2. Evaluación de la parasitemia._____	44
5.4.3. Cinética de tripomastigotes en la cavidad abdominal de ratones infectados con el aislado AM-16 de <i>Trypanosoma cruzi</i> _____	46
5.4.4. Registro del peso de los ratones infectados por las vías oral y gástrica durante la infección aguda._____	49
5.4.5. Estudio parasitológico del exudado de la cavidad abdominal de los ratones infectados con <i>T. cruzi</i> AM-16. Morfología de los tripomastigotes	

intaperitoneales	51
5.4.6 Estudio de la penetración y colonización del aislado de <i>T. cruzi</i> AM-16 en tejidos de la cavidad bucal	53
6.DISCUSIÓN	59
7. CONCLUSIONES	67
8.BIBLIOGRAFÍA	68

LISTA DE ABREVIATURAS

ADN: Ácido Desoxirribonucléico

ANOVA: Análisis de Varianza

CDC: Control Disease Center and Prevention

dNTPs: Desoxirribonucleótidos fosfatos

DNDi: Drugs for Neglected Diseases initiative

ECh: Enfermedad de Chagas

ECC: Enfermedad de Chagas Crónica

ELISA: Ensayo por Inmunoabsorción Ligado a Enzimas

Gp: Glicoproteínas

H & E: Hematoxilina y Eosina

HAI: Hemaglutinación

ICI: Infiltrado Celular Inflamatorio

IFI: Inmunofluorescencia Indirecta

Ig: Inmunoglobulina

IP: Intraperitoneal

LIT :Liver Infusion Triptose

MB: Mucosa Bucal

MG: Mucosa Gástrica

MgCl₂: Cloruro de Magnesio

MGG: May Grundwald- Giemsa

OMS: Organización Mundia de la Salud

p.i.: post infección

PBS: Phosphate-buffered saline

PCR: Polymerase Chain Reaction

SS: Solución Salina

Taq polimerasa: *Thermus aquaticus* polimerasa

T. cruzi: *Trypanosoma cruzi*

WHO: World Health Organization

XD: Xenodiagnóstico

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Distribución mundial de la Enfermedad de Chagas	2
Figura 2. Ciclo biológico de <i>Trypanosoma cruzi</i>	5
Figura 3. Mecanismo propuesto de invasión de <i>T. cruzi</i> en la mucina gástrica durante la infección oral (mucosa gástrica)	13
Figura 4. Formas de <i>Trypanosoma cruzi</i> aislado AM-16, presentes en el contenido intestinal de <i>Panstrongylus</i> sp. Silvestre	38
Figura 5. Formas de <i>T. cruzi</i> AM-16 detectadas en el contenido intestinal de <i>R. prolixus</i> (xenodiagnóstico)	41
Figura 6. Diagnóstico molecular del aislado AM-16 en la especie <i>Trypanosoma cruzi</i> mediante PCR	42
Figura 7. Supervivencia de ratones inoculados con 2×10^5 parásitos/ratón de <i>T. cruzi</i> aislado AM-16, infectados a través de diferentes vías de administración	44
Figura 8. Comparación de la evolución de la parasitemia de los ratones infectados con 2×10^5 parásitos/ratón de <i>T. cruzi</i> aislado AM-16, inoculados a través de diferentes vías de administración	46
Figura 9. Cinética de tripomastigotes presentes en la cavidad abdominal de ratones infectados experimentalmente por tres vías de inoculación diferentes con el aislado AM-16 de <i>Trypanosoma cruzi</i>	48
Figura 10. Evaluación del peso de los ratones infectados con <i>T. cruzi</i> AM-16 por distintas vías de administración	50
Figura 11. Esplenomegalia detectada en ratones infectados por vía oral con aislado AM-16.	51
Figura 12. Formas libres de <i>T. cruzi</i> aislado AM-16 presentes en el exudado peritoneal de ratones NMRI a los 21 d.p.i.	52

Figura 13. Macrófagos con parásitos intracelulares detectados en muestras de exudado peritoneal de ratones infectados con *T. cruzi* aislado AM-16 a los 21 d.p.i. _____53

Figura 14. Aspecto histológico del infiltrado celular inflamatorio observado a las 24 horas en lengua de ratón infectado con *T. cruzi* AM-16, vía oral-cavidad bucal. _____54

Figura 15. Aspecto histológico del infiltrado celular inflamatorio observado a las 72 horas en lengua de ratón infectado con *T. cruzi* AM-16, vía oral-cavidad bucal. _____55

Figura 16. Foco inflamatorio observado a las 24 horas en región pilórica de estómago de ratón infectado con *T. cruzi* AM-16, vía oral-cavidad bucal. _____56

Figura 17. Corte histológico de la región fúndica de estómago de ratón con 48 horas de infección con *T. cruzi* AM-16, vía oral-cavidad bucal, donde se observan zonas con abundante infiltrado celular inflamatorio. _____57

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Brotes de la ECh en Venezuela	18
Tabla 2. Condiciones del ensayo por PCR de <i>Trypanosoma cruzi</i>	27
Tabla 3. Condiciones del ciclado estandarizadas para la amplificación de ADN nuclear de <i>T. cruzi</i>	28
Tabla 4. Evaluación parasitológica de ratones inoculados con tripomastigotes sanguíneos de <i>T. cruzi</i> . aislado AM-16: determinación del periodo prepatente.	39
Tabla 5. Evaluación parasitológica de ratones inoculados con tripomastigotes extraídos de la cavidad abdominal de <i>T. cruzi</i> . aislado AM-16: determinación del periodo prepatente.	40

RESUMEN

Palabras claves: *T. cruzi*, oral, mucosa, bucal, *Panstrongylus*, AM-16.

La enfermedad de Chagas (ECh), causada por el flagelado *Trypanosoma cruzi* es considerada como una enfermedad desatendida, representando un problema tanto en salud pública como a nivel económico, con una prevalencia de 6 a 7 millones de personas infectadas, principalmente en América Latina (OMS, 2017). Hasta hace unos años, la vía de transmisión oral de *T. cruzi* al hombre fue considerada como rara e inusual, no obstante, el número de casos por contaminación oral ha sido más frecuente en las últimas décadas, debido a la ingesta accidental de alimentos y bebidas contaminadas con heces del vector (chipo). Durante los años 2007-2014 se emitieron reportes de 10 brotes de la enfermedad de Chagas en zonas urbanas del Distrito Capital y otras regiones de Venezuela por vía oral, con aproximadamente 249 casos descritos, algunos de ellos fatales (Alarcón de Noya y col.,2015).

En este trabajo se llevaron a cabo evaluaciones parasitológicas, moleculares e histológicas con el aislado AM-16 de *T. cruzi*, proveniente de *Panstrongylus* sp., capturado en el interior de una vivienda del Municipio Sucre del Dto. Capital-Venezuela. La inclusión del aislado AM-16 en la especie *Trypanosoma cruzi* fue demostrada mediante PCR (Moser y col., 1989). Distintos grupos de ratones fueron infectados por vía oral: mucosa bucal y mucosa gástrica y por vía intraperitoneal, resultando en una variación en el comportamiento parasitológico del aislado según la vía de inoculación. El estudio del exudado peritoneal de los ratones infectados, indicó que los valores promedios de la concentración de tripomastigotes en la cavidad abdominal fueron más elevados que los de parasitemia. Así mismo, se registraron diferencias en la sobrevivencia de los ratones de acuerdo a la vía de administración. La presencia de infiltrados celulares inflamatorios (ICI) en las fibras musculares de la lengua a las 24 y 72 horas post-infección y la alteración de la estructura de estas fibras, así como la presencia de focos inflamatorios en el estómago a las 24 y 48 horas, fue indicativo de la penetración de los tripomastigotes en estos órganos, los cuales nos permite ponerlos como puerta de entrada del parásito durante la infección experimental en la mucosa bucal. Estos resultados podrían extrapolarse al ser humano, sugiriendo a los tejidos epiteliales de la lengua y mucosa gástrica como susceptibles a la penetración del parásito durante la ingesta de alimentos contaminados.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. La enfermedad de Chagas.

La enfermedad de Chagas o Mal de Chagas, es una dolencia causada por el protozoo flagelado *Trypanosoma cruzi*. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), ha sido designada como una enfermedad tropical desatendida, y después de la Malaria y la Bilharzia, es considerada como la parasitosis más importante en Latinoamérica por su gran impacto social y económico (Mosca y Briceño, 1993; Coura y col., 2009). Es endémica de esta región, encontrándose distribuida desde el Norte de México hasta el Sur de Argentina y Chile. En las últimas décadas, han ocurrido cambios en la epidemiología de esta enfermedad debido al aumento de la migración de individuos infectados, generalmente asintomáticos, desde áreas endémicas a zonas no endémicas, ampliando así la distribución mundial de esta parasitosis (DNDi, 2015) (figura 1). En este sentido, en países de América del Norte, Europa, Japón y Australia, se está reconociendo la frecuencia de esta enfermedad, lo que ha conducido a las autoridades sanitarias a incluir pruebas específicas en los bancos de sangre de los centros de salud, a fin de identificar y descartar como donadores a las personas contaminadas que tienen el potencial de transmitir la infección a través de transfusiones de sangre y trasplantes de órganos (Gascón y col., 2010; Weiss, 2011; Repetto y col., 2015).

En la actualidad, el Mal de Chagas representa una amenaza potencial para casi un cuarto de la población de América Central y del Sur, estando asociada a la pobreza existente en áreas rurales de 21 países de estas regiones. De acuerdo a lo reportado a principios de la década de los 90, en Latinoamérica existían aproximadamente 16 a 18 millones de personas infectadas y 100 millones en riesgo de contraer la infección (WHO, 1991). En

1.2. *Trypanosoma cruzi*: agente etiológico de la enfermedad de Chagas.

El parásito *Trypanosoma cruzi* es un protozooario flagelado, considerado el agente etiológico de la enfermedad de Chagas. Su clasificación taxonómica actual de acuerdo al Comité de Sistemática y Evolución de la Sociedad de Protozoología es la siguiente:

Reino: Protista

Sub-Reino: Protozoa

Phylum: Sarcomastigophora

Subphylum: Mastigophora

Clase: Zoomastigophorea

Orden: Kinetoplastida

Familia: Tripanosomatidae

Presenta un ciclo biológico heteroxeno que incluye dos tipos de hospedadores: un vertebrado mamífero, con un amplio rango de especies silvestres y domésticas, y al ser humano, y un hospedador invertebrado, insectos hematófagos que actúan como vectores (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae), conocidos comúnmente como “chipo”, “pito”, “vinchuca” o “kissing bug” (Brener y Chiari, 1963). Entre los vectores de mayor importancia epidemiológica en Latinoamérica se encuentran los pertenecientes a los géneros *Triatoma*, *Panstrongylus* y *Rhodnius* (Brener y col., 2000; WHO, 2015).

Diversos estudios sobre aspectos biológicos, bioquímicos y moleculares de *T. cruzi*, han demostrado que la diferencia en cuanto a la virulencia (patogenicidad) mostrada por las distintas cepas del parásito, así como la producción de diversas patologías en el ser humano y mamíferos que infecta, se deben en parte al pleomorfismo natural que presenta este parásito (Zingales y col., 2009; Añez y col., 2004). Ensayos realizados empleando el modelo murino, han demostrado que la supervivencia de ratones BALB/c varía de acuerdo al inóculo de parásitos utilizado, estando asociada a la carga parasitaria cardíaca detectada en los ratones durante la fase aguda experimental. Así mismo,

reportan que la constitución genética del hospedador es determinante en la supervivencia, control de la infección y desarrollo de la patología cardíaca (Sanoja, 2010).

1.3. Ciclo de vida de *Trypanosoma cruzi*.

El protozoario *T. cruzi* presenta cuatro estadios morfológicos principales: tripomastigote metacíclico, tripomastigote sanguíneo, epimastigote y amastigote. El ciclo de vida del parásito inicia cuando los tripomastigotes sanguíneos son ingeridos por el insecto vector (triatomino) al alimentarse de los mamíferos infectados, transformándose en formas cortas al llegar estómago del insecto. De allí migran hacia el intestino medio, donde continúan desarrollándose hasta encontrar un ambiente adecuado, transformándose en epimastigotes, que se multiplican por fisión binaria longitudinal. Estos epimastigotes migran hacia la porción posterior del intestino del triatomino, donde evolucionan en el ámpula rectal hacia la forma de tripomastigotes metacíclicos, fase infectante para el hospedador vertebrado. Cuando el insecto infectado pica a un hospedador sano para alimentarse, defeca sobre la piel y junto con las heces son eliminados los tripomastigotes metacíclicos. Estos pueden penetrar en el mamífero a través de la lesión provocada por la probóscide del insecto, o bien a través de heridas preexistentes, conjuntiva del ojo o por la mucosa bucal, e invadir las células de tejidos cercanos al lugar de penetración (figura 2) (Becerril, 2011; CDC, 2015; Guzmán-Marín y col., 1999).

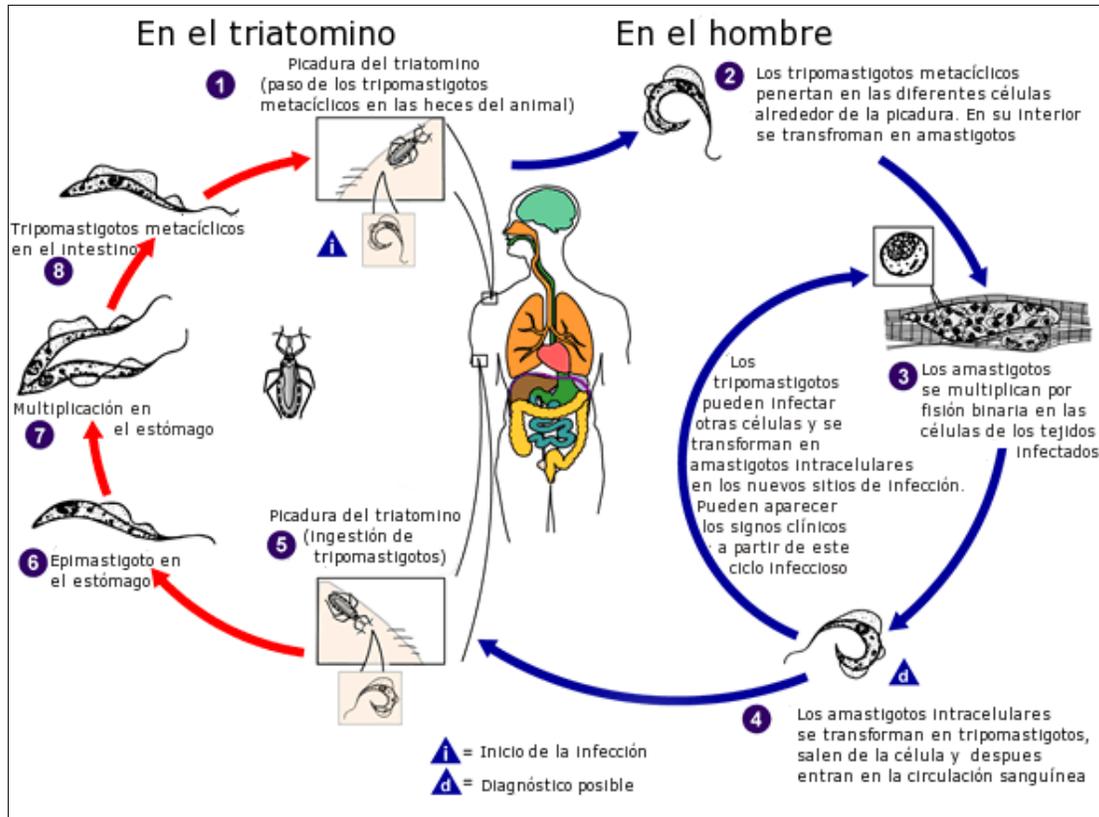


Figura 2. Ciclo biológico de *Trypanosoma cruzi*. Imagen tomada de la página web de Center Disease Control and Prevention (CDC).

(<https://www.cdc.gov/parasites/chagas/biology.html>) [Consultado: 24 de Julio de 2016].

Se ha demostrado que en el ser humano, una vez dentro de la célula, los tripomastigotes sufren un proceso de desarrollo que culmina en la formación de amastigotes replicativos, que proliferan en el citoplasma de la célula hospedadora durante 5-6 días, hasta que ocupan la mayor parte del volumen celular. En esta etapa, la división de los amastigotes cesa y se produce la diferenciación a tripomastigotes, seguido por la rotura de la membrana plasmática de la célula con la consecuente liberación de los tripomastigotes que migran en el torrente sanguíneo y son capaces de invadir zonas lejanas al lugar de penetración (Costales y Rowland, 2007; De Souza, 2002). Estudios *in vitro* demostraron la penetración

de las formas delgadas de tripomastigotes de *T. cruzi* al interior de las células en dos horas aproximadamente y señalan que la característica fisiológica más importante de los amastigotes es la recuperación de la capacidad de multiplicación, que se manifiesta cerca de 35 horas después de la invasión de la célula hospedadora (Rey, 1991). Mediante una división binaria simple que se repite a intervalos de 12 horas, cada amastigote produce un número creciente de elementos-hijos semejantes, que poco a poco van consumiendo el citoplasma de la célula parasitada, hasta que al cabo de unas 12 horas, antes de romperse la célula hospedadora, sufren una nueva transformación, ahora en el sentido amastigote a tripomastigote. El ciclo celular, dura al parecer 5 o 6 días y se producen cerca de nueve generaciones de parásitos, cualquiera que sea el tipo de célula infectada (Rey, 1991).

1.4. Mecanismos de transmisión de la enfermedad de Chagas.

Entre los principales mecanismos de transmisión de *T. cruzi* al ser humano se encuentran:

1. Transmisión vectorial: ocurre mediante el contacto del hombre u otro hospedador vertebrado con las heces del vector infectado. Este tipo de transmisión corresponde al mecanismo de contagio más frecuente, siendo responsable de más del 80% de los casos diagnosticados como enfermedad de Chagas en zonas endémicas (Pinto-Días, 2000; Brener, 2000).

2. Transmisión congénita o vertical: *T. cruzi* puede alcanzar la circulación fetal por vía hematológica como resultado de una placentitis, encontrándose focos inflamatorios agudos y/o crónicos en la placenta, áreas de necrosis y parasitismo en células trofoblásticas y macrófagos, y el parásito es capaz de penetrar en forma activa en la circulación fetal (Gürtler y col., 2003).

3. Transmisión por transfusiones sanguíneas: este tipo de contaminación se ha extendido en las áreas endémicas a causa de la falta de control en los bancos de sangre. Debido a la persistencia de las formas sanguíneas en pacientes crónicos, estas personas pueden ser responsables de la transmisión del parásito a través de la donación de sangre a lo largo de su vida, incluso cuando son asintomáticos y desconocen su condición de pacientes chagásicos. Como se mencionó anteriormente, este se ha convertido en un problema potencial de salud pública en países desarrollados de Europa, Asia, Estados Unidos y Canadá, debido a las constantes migraciones de personas infectadas provenientes de zonas endémicas para la enfermedad de Chagas (Patterson y Guhl, 2010; Gascón y col., 2010).

4. Transmisión oral: se produce por la ingesta de alimentos contaminados con *T. cruzi*, donde la entrada del parásito al organismo ocurre a través de la mucosa bucal. El hombre, como hospedador vertebrado, puede infectarse de forma accidental al ingerir alimentos contaminados con las heces de vectores infectados (Segovia y col., 2014). Reportes indican que las ninfas infectadas son capaces de contaminar fácilmente los alimentos, debido a que por su pequeño tamaño (ninfa estadio 1 mide alrededor de 2mm), pueden pasar desapercibidas para el operario de los alimentos (Días y col., 2006; Alarcón de Noya y col., 2010, Robertson y col., 2016).

En el año 2012, un grupo de investigadores ponderaron, los parásitos transmitidos al ser humano por contaminación de alimentos en diferentes regiones del mundo. Este estudio fue realizado con base a criterios epidemiológicos, clínicos y socioeconómicos, ocupando *Trypanosoma cruzi* el décimo lugar de importancia en un grupo de 24 parásitos (Robertson y col., 2013).

5. Otros mecanismos de transmisión: trasplantes de órganos y accidentes en laboratorios de investigación debidos a la manipulación de instrumentos punzantes contaminados con el parásito, constituyen otros modos de transmisión menos frecuentes.

1.5. Fases de la enfermedad de Chagas.

Se han descrito dos etapas o fases relevantes de la enfermedad de Chagas: la fase aguda y la fase crónica. En la etapa aguda inicial, la mayoría de los pacientes padecen la forma no aparente (asintomáticos), mientras que los restantes, por lo general muestran una enfermedad febril no específica. Durante la fase crónica hay dos formas bien definidas de la enfermedad: 1) Indeterminada (latente, preclínica) y 2) Determinada (clínica) o Crónica Tardía. Dependiendo de la cepa de *T. cruzi*, durante la fase crónica tardía 10%-30% de los pacientes pueden desarrollar formas crónicas cardíacas, digestivas (por lo general expresadas como megaesófago y/o megacolon), y formas cardiodigestivas, asociadas a alteraciones en el sistema nervioso central (Hontebeyrie y col., 2010; DNDi, 2015).

1.5.1. Fase aguda

En la etapa inicial de la enfermedad, pueden presentarse sintomatologías graves (sólo aparente en 5% de los casos) o ser tan leve que puede pasar desapercibida (95% restante). En este último caso, los síntomas son tan generales que la persona afectada por lo general no acude al médico, trayendo como consecuencia que no se llegue al diagnóstico oportuno. Las manifestaciones clínicas de esta fase pueden aparecer alrededor de 8 a 10 días después de la penetración de *T. cruzi* al organismo, pudiendo detectarse altas parasitemias y abundantes parásitos en los tejidos (Lugones y col., 1979; Rassi y col., 2000).

Clínicamente, una infección chagásica inicia con un conjunto de manifestaciones donde las variables en frecuencia e intensidad se dan por la señal de la puerta de entrada del parásito

o lugar inicial de la infección, síntomas generales y alteraciones sistémicas. El sitio inicial de la infección puede ser: aparente o bien inaparente. Cuando la infección es aparente, puede ocurrir una manifestación ocular denominada Signo de Romaña, o una cutánea, conocida como Chagoma de inoculación. El Signo de Romaña, consiste esencialmente en la formación de un edema bpalpebral-unilateral, elástico e indoloro, de inicio brusco generalmente, con una coloración rosa-violeta de los párpados, congestión conjuntival y exceso de ganglios linfáticos satelitales. Mientras que el Chagoma de inoculación, se presenta como una formación cutánea ligeramente saliente, redondeada, que abarca pocos centímetros de diámetro, eritematosa, dura e indolora o poco dolorosa, caliente y rodeada por edema elástico, que se asemeja a un furúnculo que no llega a la supuración; también puede estar acompañado de inflamación de los ganglios linfáticos satelitales y puede localizarse en cualquier parte del cuerpo, sobre todo en aquellas descubiertas durante el sueño.(Brener y col., 2000).

Como manifestaciones generales se encuentran, fiebre, malestar general, cefalea, astenia, y pérdida parcial del apetito. Entre las manifestaciones sistémicas destacan: edema subcutáneo (localizado generalmente en la cara, piernas y pies), aumento del volumen de ganglios linfáticos, hepatomegalia y esplenomegalia. Estas patologías suelen aparecer en el ser humano en torno a la segunda y tercera semana de la enfermedad. (Brener y col, 2000; DNDi, 2015)

La mortalidad registrada durante la fase aguda se encuentra aproximadamente en 5% en los casos sintomáticos, muchos a consecuencia de patologías tales como, meningoencefalitis y miocarditis y la mayoría en niños menores a cinco años. Favorablemente, esta tasa de mortalidad ha disminuido en la actualidad como resultado del uso de drogas específicas en el momento inicial de la infección (Rassi y col., 2010).

1.5.2 Fase crónica

La fase crónica, comienza de 2 a 3 meses después de la infección inicial, cuando las manifestaciones clínicas de la fase aguda, en caso de haberse presentado, ya han desaparecido, y la parasitemia cae a niveles indetectables (Rassi y col., 2010). Los pacientes pasan a una etapa crónica inicial denominada fase indeterminada o latente, caracterizada por la ausencia de manifestaciones clínicas, electrocardiográficas y radiológicas de los fenómenos cardíacos y digestivos. La ausencia de parásitos circulantes durante esta fase puede extenderse de 10 a 20 años antes de que el paciente presente los daños característicos de la enfermedad de Chagas (Ribeiro y Costa, 2000; DNDi, 2015). Sin embargo, se han reportado casos en los que se presentan alteraciones electrocardiográficas, como taquicardias y arritmias, pudiendo ocurrir en algunos pacientes la muerte súbita sin causa aparente (Becerril, 2011). Luego de transcurridas una o dos décadas desde el inicio de la infección, cerca de un tercio de los pacientes comienzan a presentar los síntomas de la etapa crónica tardía. Estos síntomas tienen dos orígenes principalmente: cardíaco y digestivo, pudiéndose presentarse de forma aislada o en asociación y también puede verse afectado, pero con menos frecuencia, el sistema nervioso central y periférico. La forma cardíaca es considerada la más severa y frecuente manifestación clínica de la enfermedad de Chagas Crónica (ECC). Se desarrolla en un 20% a 30% de los individuos infectados y presenta tres síndromes principales que pueden coexistir en el mismo paciente: arritmias, fallas cardíacas y tromboembolismo (sistemático y pulmonar) (Rassi y col., 1992, 2000; WHO, 2015). La prevalencia de estas manifestaciones y el tropismo del parásito, han sido vinculados a las distintas cepas de *T. cruzi* y a su origen geográfico, existiendo una gran heterogeneidad (Rassi y col., 1992).

1.6. Métodos para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas.

Los exámenes realizados para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas dependerán de la etapa clínica en la que se encuentre la persona infectada.

Los estudios realizados durante la etapa aguda se centran en buscar y reconocer el parásito en muestras de sangre, a través de métodos parasitológicos. Durante las etapas iniciales se encuentran altas parasitemias y a medida que transcurre la infección van disminuyendo hasta hacerse mínimas y aleatorias. En la fase crónica (inaparente o indeterminada y sintomática) la parasitemia suele ser transitoria y por ello el diagnóstico se realiza fundamentalmente mediante el hallazgo de anticuerpos circulantes contra *T. cruzi* (serología) y/o mediante métodos moleculares.

Entre los métodos parasitológicos implementados para el diagnóstico de la ECh durante la fase aguda, se encuentran ensayos parasitológicos directos tales como: exámenes de sangre mediante el uso de un microscopio óptico (gota fresca o gota gruesa), extendidos de sangre teñidos con la coloración de Giemsa, May Grundwald- Giemsa (MGG) y, la técnica del hematocrito de mayor sensibilidad. Así mismo, existen métodos parasitológicos indirectos basados en la multiplicación del parásito, tales como el hemocultivo y el xenodiagnóstico (XD) entre otros. Este último diseñado por Brumpt en el año 1914, mediante el cual se amplifica la señal biológica del parásito con el uso de triatominos hematófagos sanos.

Los métodos inmunológicos para la detección de *T. cruzi* se emplean tanto en la etapa aguda como en la crónica. La aplicación de técnicas tradicionales para la detección de *T. cruzi* en sangre se basa en pruebas serológicas, que detectan anticuerpos contra ciertos constituyentes del parásito (Brener y Krettli, 1990). Estos métodos poseen alta sensibilidad

pero su especificidad generalmente es poco satisfactoria, debido a reacciones cruzadas con antígenos de otros parásitos (tripanosomatideos). Entre los ensayos más utilizados se encuentran: hemaglutinación (HAI), inmunofluorescencia indirecta (IFI) y el ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA), siendo este último el más implementado debido a su alta sensibilidad y especificidad. Otra técnica conocida como inmunoelectrotransferencia, es aún más compleja y específica y se fundamenta en la detección de proteínas antigénicas del parásito *T. cruzi* con la capacidad de desencadenar una respuesta humoral en los pacientes (Becerril, 2011). No obstante, se aplica más en investigaciones científicas que para el diagnóstico de pacientes.

En las últimas décadas, se ha incrementado la aplicación de métodos moleculares para el diagnóstico de la infección. La Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) se fundamenta en la obtención de forma rápida y simple de múltiples copias de secuencias determinadas de ADN altamente repetitivas a partir de muestras biológicas (Mullis y Faloona, 1987; Mas y col., 2015). En el año 1999, Chiari y colaboradores (Chiari y col., 1999) demostraron que cierta secuencia en el ADN de *T. cruzi* podía ser amplificada con una alta especificidad. Debido a que el diagnóstico certero mediante exámenes parasitológicos es poco eficaz, durante la fase crónica principalmente, se ha prestado especial atención al diagnóstico mediante PCR, debido a su alta sensibilidad y especificidad.

1.7. La mucosa bucal y gástrica como puerta de entrada de *T. cruzi*.

Estudios en modelos animales llevados a cabo por Hoft en el año 1996 (Hoft, 1996), indicaron que los tripomastigotes metacíclicos de *T. cruzi* son capaces de invadir el epitelio de la mucosa gástrica. Posteriormente, otros reportes demostraron que en este proceso de

invasión, intervienen glicoproteínas (Gp) específicas del estadio tripomastigotes, como la Gp82 y Gp90, uniéndose la primera a la mucina gástrica y a las células epiteliales mediante la activación de la señalización con Ca^{++} , promoviendo así la penetración del parásito a las células, mientras que la Gp90 regularía negativamente el proceso de infección (Yoshida, 2009). Los tripomastigotes Gp82 deficientes interactúan poco con la mucina gástrica en comparación con la población de tripomastigotes metacíclicos que expresan Gp82 ($Gp82^{+}$). La presencia de estas glicoproteínas en la superficie de los tripomastigotes varía de una cepa a otra (Yoshida, 2009). La figura 3 muestra el mecanismo de invasión propuesto para *T. cruzi* en la mucosa gástrica durante la infección oral (Yoshida 2009; Díaz y González, 2014).

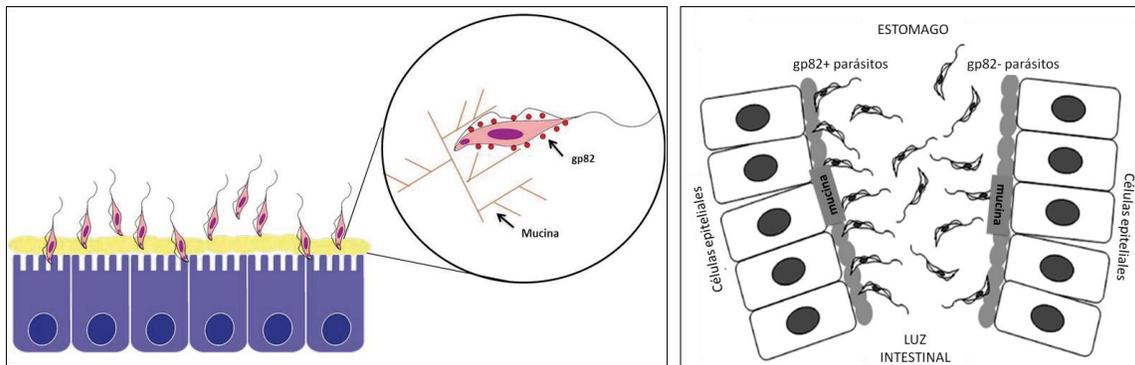


Figura 3. Mecanismo propuesto de invasión de *T. cruzi* en la mucina gástrica durante la infección oral (mucosa gástrica).

La gp82 presente en la superficie de los tripomastigotes metacíclicos les permite unirse y atravesar la capa de mucina del estómago, así como adherirse e invadir las células del epitelio gástrico en un mecanismo mediado por iones Ca^{++} . Los tripomastigotes deficientes en Gp 82 ($Gp82^{-}$) interactuarán menos con la superficie de la mucosa y lo contrario ocurre con los parásitos $Gp 82^{+}$. Tomado y modificado de Yoshida, 2009; Díaz y González, 2014.

Por ser una puerta de comunicación con el exterior, la cavidad oral de los mamíferos está constituida por una membrana de superficie húmeda, necesaria para el mantenimiento de la estructura normal de los tejidos. Anatómicamente, comprende una serie de estructuras en las que se incluyen la lengua, los dientes y sus medios de sostén (periodonto), las amígdalas y las glándulas salivales principales y accesorias. Esta cavidad se encuentra dividida en: un vestíbulo que es el espacio existente entre labios, mejillas y dientes, y una cavidad oral propiamente dicha que se localiza detrás de los dientes y está limitada hacia arriba por el paladar duro y el paladar blando, hacia abajo por la lengua y el piso de la boca y hacia atrás por el istmo de las fauces. La cavidad oral se encuentra tapizada por tres tipos de mucosas: masticatoria, especializada y de revestimiento. La mucosa de revestimiento conforma parte de los labios, las mejillas, la superficie mucosa alveolar, el piso de la boca, la superficie ventral de la lengua y el paladar blando. Estos sitios están tapizados por músculo estriado (labios, mejillas y lengua), hueso (mucosa alveolar) y glándulas (paladar blando, mejillas y superficie ventral de la lengua). La mucosa de revestimiento, en general, posee un epitelio no queratinizado (excepto el borde libre del labio) o paraqueratinizado en algunos sitios. El epitelio no queratinizado está compuesto por tres capas: estrato basal, estrato espinoso y estrato superficial o capa superficial de la mucosa. Las células del epitelio de la mucosa están comprendidas por queratinocitos, células de Langerhans, melanocitos y células de Merkel (Ross y Pawlina 2007).

En este trabajo de investigación propusimos que durante la infección experimental a través de la vía oral en la cavidad bucal, las células epiteliales y musculares de las mejillas y el tejido de la base de la lengua de los ratones, así como la mucosa gástrica, podrían constituir posibles blancos o puertas de entrada para la penetración y colonización del aislado AM-16

de *T. cruzi*. En este sentido, una serie de técnicas parasitológicas, histológicas y moleculares fueron aplicadas y ejecutadas por la autora de este trabajo, a fin de llevar a cabo este y el resto de los objetivos propuestos.

2. ANTECEDENTES

La transmisión oral de *T. cruzi* había sido considerada durante los años 1930 y 1950 como un mecanismo de transmisión que ocurría en animales silvestres a través de la ingesta de heces del triatomino durante la depredación del insecto. Posteriormente se verificó que este tipo de transmisión podría afectar también al ser humano (Tosso y col., 2011).

En los últimos años esta forma de transmisión, inicialmente rara e inusual, ha sido motivo de alarma en países como Brasil, Venezuela y Colombia por la presencia de microbrotes de enfermedad de Chagas aguda, asociados a la ingesta de alimentos o bebidas contaminadas con *T. cruzi*, que se supone estuvieron en contacto con heces de triatominos infectados o con secreciones de los reservorios (Díaz y González, 2014). Las desforestaciones y el calentamiento global han afectado y cambiado el ambiente donde habitan naturalmente los vectores y reservorios de *T. cruzi*, por lo que los insectos han cambiado su comportamiento desplazándose a zonas urbanas y generando una novedosa forma de transmisión al ser humano que requiere su evaluación en países suramericanos (Rueda y col., 2014).

Numerosos casos de transmisión oral en el hombre han sido reportados en países de América del Sur. A continuación se describe brevemente:

Brasil: El primer caso documentado de este tipo de transmisión corresponde al año 1965, Teutonia, Río Grande del Sur, registrándose 17 pacientes con enfermedad de Chagas aguda simultánea. Esta infección no pudo ser explicada por el mecanismo tradicional de transmisión vectorial. Los análisis anatomopatológicos del músculo cardíaco mostraron la

presencia de nidos de *T. cruzi*. Se sospecha que las personas habrían consumido vegetales contaminados con secreciones de marsupiales (*Opossum*) infectados. (Tosso y col, 2011) Casos similares, ocurrieron en Catolé de Rocha y Santa Catariana, zonas no endémicas para la ECh. Este hecho permitió excluir la presencia del vector y sugerir que la infección podría haber ocurrido a través de la vía oral, ocurriendo la contaminación por la ingesta de jugo de caña o “acai”. Se presume que la caña de azúcar habría sido transportada de otras zonas junto con los triatominos infectados y estos fueron triturados en la máquina al preparar el jugo, contaminando la bebida con el parásito. Posteriormente en el año 2006, en el norte y noreste de Brasil se reportaron 94 casos por transmisión oral, siendo seis de ellos fatales. Al año siguiente fueron reportados 88 casos, todos relacionados con ingesta de jugo de caña contaminada con heces infectadas con *T. cruzi*. (Tosso y col. 2011).

Colombia: Solo 3 brotes de Mal de Chagas se habían reportado hasta el año 2009. El primero ocurrió en el poblado de Tibú, Norte de Santander, donde 6 soldados que habían estado en zonas selváticas presentaron miocarditis chagásica, presumiéndose la transmisión oral, debido a que no se encontró puerta de entrada del parásito, no obstante, no se pudo verificar con certeza (Tosso y col. 2011). Posteriormente, en el año 1999 en Guamal, Magdalena, fueron reportados 22 casos, de los cuales sólo uno fue verificado anatomopatológicamente mediante muestras de miocardio. Se asoció al consumo de vino de palma contaminado, debido a que en las zonas de extracción de esta bebida se encontraron triatominos infectados con *T. cruzi*. En el año 2008 la prensa de Bucaramanga, Colombia, reportó, 9 casos de transmisión por vía oral, dos de ellos fatales. Un mes después de este reporte, falleció una niña que se habría contagiado con *T. cruzi* por vía oral en la misma región (Tosso y col. 2011).

Venezuela: Durante la última década se han reportado diez brotes de ECh en zonas urbanas del territorio nacional: dos microepidemias (Chacao y Chichiriviche) y ocho brotes de pequeños grupos, en las cuales los individuos afectados han tenido como factor común haber consumido frutas o jugos caseros. En la tabla 1, se detalla cada uno de los brotes reportados en Venezuela desde el año 2007 hasta el 2014 (Alarcón de Noya y col., 2015).

Tabla 1: Brotes de la ECh en Venezuela por transmisión oral.

Tomado de Alarcón de Noya y col., 2015.

Localidad	Georeferencia	Fecha	Pacientes (n)	Adultos (n)	Niños (n)	Mortalidad n (%)	Fuente probable de infección
Chacao, Caracas, DF	10°29'39.77"N 66°51'12.07"W	Dic, 2007	103	26	77	1 (1)	Jugo de Guayaba
San José, Caracas, DF	10°29'51.95"N 66°54'16.51"W	Mayo, 2008	3	2	1	0 (0)	Desconocido
Chichiriviche, Vargas	10°31'53.97"N 67°15'36.02"W	Marzo, 2009	89	9	80	5 (5,6)	Jugo de Guayaba
Antímano, Caracas, DF	10°28'01.53"N 66°59'15.48"W	Mayo, 2010	22	5	17	1 (4,5)	Jugo de Parchita
Rubio, Táchira	7°42'00"N 72°20'60.00"W	Nov, 2010	7	4	3	1 (14,3)	Desconocido
Coche, Caracas, DF	10°26'54.07"N 66°55'28.30"W	Marzo, 2012	4	4	0	0 (0)	Desconocido
El Bordo, Mérida	8°25'40.92"N 71°35'54.62"W	Julio, 2012	5	2	3	1 (20)	Desconocido
Mirimire, Falcón	11°9'45.48"N 68°43'33.35"O	Junio, 2013	8	8	0	1 (12,5)	Desconocido
El Guapo, Miranda	10°8'48.45"N 65°58'13.89"O	Feb, 2014	3	2	1	0 (0)	Jugo de Pumarosa
SanCristobal, Táchira	7°48'36.18"N 72°12'20.07"O	Julio, 2014	5	4	1	0 (0)	Desconocido
Total	-	-	249	66	183	10 (4)	-

Cabe destacar que estudios preliminares sobre la transmisión oral experimental de *T. cruzi* fueron realizados en Venezuela por los investigadores Díaz-Ungría y colaboradores en el año 1966. Sin embargo, sólo los objetivos de estos trabajos fueron publicados, no siendo así los resultados obtenidos (Díaz-Ungría y col., 1966). Los autores reportan ensayos a fin de verificar si ocurría la infección oral por *T. cruzi* en distintos mamíferos, y así mismo para detectar si el parásito atravesaba la mucosa bucal o si era capaz de sobrevivir a los jugos gástricos (vía gástrica directamente). Como se mencionó los resultados de este trabajo lamentablemente no fueron publicados.

En el año 2014, Sanoja y colaboradores evaluaron parasitológica e inmunológicamente el resultado de la infección por vía oral (mucosa bucal) en el modelo murino, empleando aislados de *T. cruzi*, provenientes de triatomíneos y *Opossum* infectados naturalmente en el Distrito Capital-Venezuela, aislados MACH-1 y YAGUA, respectivamente. Los resultados demostraron el establecimiento y proliferación del parásito en el tejido cardíaco y la detección y proliferación de tripomastigotes libres y amastigotes intracelulares en la cavidad abdominal (exudado peritoneal) de los ratones NMRI, durante las fases aguda y crónica de la infección experimental, sugiriendo esta cavidad como un posible reservorio del parásito, donde parece evadir la respuesta inmunológica humoral. Se demostró la infectividad de los flagelados extraídos de la cavidad abdominal, siendo capaces de producir una infección crónica con bajas parasitemias en los ratones (Díaz y col., 2013; Díaz-Centeno., 2014).

En este mismo sentido, Lugo y colaboradores (Lugo y col., 2013), realizaron estudios con los aislados venezolanos de *T. cruzi* P6 y P11 altamente virulentos y con tropismo hacia la musculatura cardíaca y esquelética. Los ratones mostraron altas parasitemias y los estudios histológicos revelaron la proliferación de amastigotes y tripomastigotes en la membrana y

cavidad abdominal de los ratones infectados. Así mismo, evidenciaron una desorganización en la estructura de la membrana peritoneal, sugiriendo esta alteración como posible causa de la ascitis y peritonitis observada en los animales, conllevándolos a la muerte. Reportaron adelgazamiento y dilatación de la capa mucosa del colón, y alteraciones en la unión neuromuscular de las fibras nerviosas de las patas posteriores (Lugo y col., 2013).

Por otra parte, estudios realizados mediante ensayos de PCR a pacientes venezolanos con enfermedad de Chagas crónica, demostraron la presencia ADN de *T. cruzi* en el fluido crevicular gingival (Añez y col., 2016).

Recientemente, ensayos realizados en ratones BALB/c infectados por vía oral-cavidad bucal, con tripomastigotes de *T. cruzi* marcados con fluorescencia, demostraron la presencia del parásito en distintos tejidos de los ratones durante la fase aguda de la infección (Silva y col., 2017). Las pruebas de bioluminiscencia aplicadas *in vivo* a los animales, mostraron una señal inicial en la región nasomaxilar y sus alrededores, sugiriéndolo como sitio de invasión del parásito, siendo esta señal consistente a lo largo de la evaluación (fase aguda experimental).. Posteriormente, a los 7 y 21 días post infección, la señal bioluminiscente se observó con mayor intensidad en el tórax, abdomen y región genital, lo cual indicó la diseminación del parásito en diferentes órganos y tejidos de los animales durante la fase aguda evaluada (Silva y col., 2017).

Finalmente, cabe mencionar que en Venezuela los casos de enfermedad de Chagas oral en la región Capital (Caracas), han sido asociados al genotipo TcI, siendo este el clado predominante en el país, correspondiendo al 94,1% de las 778 muestras analizadas en los estudios moleculares llevados a cabo. (Carrasco y col., 2012, Segovia y col., 2014).

Dado lo anteriormente expuesto, con este trabajo se pretendió contribuir al estudio de infección causada por aislados venezolanos de *T. cruzi*, empleando la vía oral (mucosa bucal) como puerta de entrada del parásito en el modelo murino, simulando las condiciones de infección oral accidental en el hombre. El estudio histopatológico de la mucosa bucal y gástrica de los ratones, bajo estas condiciones de transmisión, así como los estudios parasitológicos, nos permitirán extrapolar nuestros resultados al comportamiento del parásito en el ser humano, contagiado al ingerir alimentos contaminados con aislados venezolanos de *T. cruzi*

1. OBJETIVOS

1.1. Objetivo general.

Realizar la evaluación parasitológica del aislado venezolano AM-16 de *Trypanosoma cruzi* en el modelo murino y evaluar la colonización de la cavidad bucal y gástrica debida a la infección oral.

1.2. Objetivos específicos.

1. Evaluar parasitológicamente el intestino del insecto silvestre *Panstrongylus* sp., aislar los flagelados y establecer el ciclo biológico del parásito, empleando el modelo ratón-*Rhodnius prolixus*.
2. Caracterizar genéticamente el aislado AM-16 de *Trypanosoma* sp. proveniente de *Panstrongylus* sp.
3. Realizar y comparar la evaluación parasitológica de ratones NMRI infectados a través de la vía oral (mucosa bucal y gástrica) e intraperitoneal con el aislado AM-16 de *T. cruzi*, durante la fase aguda.
4. Realizar y comparar el estudio histológico de la mucosa bucal y gástrica de ratones NMRI sanos e infectados con *T. cruzi* por vía oral-cavidad bucal.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Material biológico.

Para realizar la evaluación parasitológica e histológica del aislado de *Trypanosoma cruzi* se empleó el modelo murino.

Ratones: *Mus musculus*, cepa NMRI, de 6 semanas de edad, peso promedio 20 gramos, hembras, procedentes del Bioterio del Instituto de Biología Experimental (IBE), UCV.

Parásitos: Se utilizó un aislado de *Trypanosoma* sp. denominado AM-16, procedente del hospedador silvestre *Panstrongylus* sp. capturado en el interior de una vivienda ubicada en el Sector Santa Clara, Calle Píritu, El Cafetal, Municipio Baruta, Distrito Capital-Venezuela.

4.2. Establecimiento del ciclo experimental del parásito *T. cruzi* aislado AM-16.

Se estableció el ciclo experimental del aislado empleando el modelo ratón-*Rhodnius prolixus*.

4.2.1. Evaluación parasitológica de *Panstrongylus* sp. y transmisión de la infección a ratones NMRI.

A fin de detectar la presencia de flagelados en el insecto silvestre, se llevó a cabo la disección del abdomen y extracción del intestino. Este fue colocado en solución salina (SS) al 0,85% y se realizó un examen microscopio del contenido intestinal. Tras el análisis positivo a parásitos, se preparó una suspensión de los flagelados en “buffer” fosfato salino (PBS) y fue inoculada en dos ratones sanos por vía intraperitoneal (i.p.) a razón de 0,2 ml de suspensión/ratón a fin de transmitir la infección.

Los ratones fueron evaluados diariamente a partir del día 6 post infección (p.i.) hasta detectar la presencia de tripomastigotes sanguíneos. Para ello se cortó la punta de la cola del ratón y las muestras de sangre extraídas fueron evaluadas mediante un examen parasitológico directo (examen al microscopio óptico a 400X) para comprobar la presencia de tripomastigotes sanguíneos.

4.2.2 Mantenimiento de *T. cruzi* AM-16 en ratones NMRI mediante pases ratón-ratón: períodos prepatente, patente y subpatente.

Con el objetivo de simular las condiciones del pase del parásito de un ratón a otro (repique) para la estandarización y mantenimiento del ciclo experimental del aislado, grupos de 2, 3 y 4 ratones por grupo, fueron inoculados por vía i.p. con una suspensión de tripomastigotes sanguíneos (no se cuantificó la cantidad parásitos administrada). Para preparar la suspensión de parásitos se colocaron 3 a 4 gotas de sangre de la cola cortada de un ratón infectado (aproximadamente 15 µl) en PBS.

Otros grupos distintos de 2 y 3 ratones por experimento, fueron inoculados por vía i.p. con una suspensión de tripomastigotes obtenidos de la cavidad abdominal de un ratón infectado como se describe a continuación: se utilizó una inyectora acoplada a una aguja de 26g x ½” y se inyectó 1 ml de PBS estéril en la cavidad abdominal del ratón, tras un ligero masaje al abdomen se extrajo el líquido hasta coleccionar aproximadamente 300 µL en un tubo Eppendorf®. Muestras del exudado fueron examinadas al microscopio a 400X para comprobar la presencia y abundancia de tripomastigotes (Díaz, 2014). De igual manera el inóculo tampoco fue cuantificado.

La evaluación parasitológica en sangre y cavidad abdominal de los ratones infectados, se llevó a partir del día 6 p.i., cada dos días durante las dos primeras semanas y luego tres veces por semana hasta el día 31 p.i., mediante un examen microscópico directo para detectar la presencia de los flagelados. El procedimiento para detectar la presencia de tripomastigotes en la cavidad abdominal, fue el mismo descrito anteriormente en este apartado.

Esto nos permitió determinar el período de detección y desaparición de los parásitos en los ratones de los repiques. La mortalidad fue registrada diariamente

4.2.3. Mantenimiento de *T. cruzi* AM-16 en *Rhodnius prolixus*: xenodiagnóstico.

Ninfas sanas de *R. prolixus* de III y IV estadio de desarrollo fueron alimentadas con sangre de los ratones infectados (xenodiagnóstico). A los 15 días, muestras de heces de las ninfas fueron colectadas y colocadas en SS. Se examinaron en fresco a 400X para detectar los flagelados. Este procedimiento se repitió una vez por semana hasta comprobar la infección en los insectos. La sensibilidad del xenodiagnóstico es 200 parásitos/mL de sangre (Sanoja, 2001). Se prepararon extendidos de las heces en láminas y colorearon con tinción Giemsa (ver más adelante apartado 4.6). El xenodiagnóstico se realizó por duplicado. Una vez detectados los parásitos en los insectos, se preparó una suspensión con los flagelados en PBS y se inoculó en ratones NMRI sanos para completar el ciclo experimental. Estos ratones fueron monitoreados parasitológicamente a fin de constatar la infección.

4.3. Caracterización genética del aislado de *Trypanosoma* sp.

4.3.1. Obtención de las muestras.

Se emplearon muestras de sangre completa y de exudado peritoneal de ratones infectados con el aislado AM-16, en los que se confirmó la presencia de una elevada cantidad de tripomastigotes. Así mismo, se procesaron muestras de epimastigotes de *T. cruzi* cepa CL-Brener provenientes de un cultivo en medio LIT (Liver Infusion Tryptose).

4.3.2. Aislamiento del ADN total.

Las muestras fueron procesadas utilizando el estuche (“kit”) Genomic DNA Purification Kit Protocol marca comercial Wizard® - Promega, de acuerdo a las instrucciones de la casa comercial. El método está basado en: 1) lisado de células y núcleos 2) remoción de proteínas por precipitación en presencia de sales (tampón de lavado) manteniéndose el ADN en solución y 3) concentración del ADN genómico por precipitación con isopropanol. Las muestras de ADN obtenidas se mantuvieron entre 2-8 °C hasta su uso.

4.3.3. Determinación de la concentración de ADN.

La concentración de ADN (ng/μl) se estimó a partir de 2 μl de muestra, mediante el uso de un espectrofotómetro NanoDrop™ 1000 a una longitud de onda de 260 nm.

4.3.4. Amplificación de ADN.

Se empleó el protocolo descrito por Moser y colaboradores en el año 1989 (Moser y col., 1989). Para ello se emplearon los cebadores TZ1 y TZ2 (Beckman Instruments, Inc.) que amplifican las secuencias 5'-CGAGCTCTTGCCACACGGGTGCT-3' y

5'CCTCCAAGCAGCGGATAGTTC AGG-3' respectivamente, correspondientes a una familia de 188 pares de bases (pb) de ADN altamente repetitivas que constituye aproximadamente 9% del ADN nuclear en *T. cruzi*. (Moser y col. 1989).

Como control positivo de la reacción de PCR ADNk se empleó ADN genómico de *T. cruzi* de la cepa CL Brener y como control negativo agua milli-Q. Se utilizaron 60ng de ADNk en cada reacción y el programa de PCR se llevó a cabo en un termociclador (Termocycler Eppendorf). En las tablas 1 y 2 se describen las condiciones utilizadas en este ensayo estandarizadas por Da Silva (Da Silva, 2015).

Tabla 2. Condiciones del ensayo PCR *Trypanosoma cruzi*.

Reactivo	Concentración del stock	Concentración final	Vol./reacción (µL)
Agua destilada	-	-	15,5
Tampón5X (Tris-HCl 250 mM [pH 9,0], NaCl 250 mM).	5X	1X	5
Oligo TZ1	10 µM	0,2 mM	0,5
Oligo TZ2	10 µM	0,2 mM	0,5
MgCl ₂	25 mM	1,5 mM	1,5
dNTPs	40 mM	800 µM	0,5
Taq polimerasa	5 U		0,5
Muestra	-	100ng	1
Volumen final	-	-	25

Tabla 3. Condiciones del ciclado estandarizadas para la amplificación de ADN

nuclear de *T. cruzi*

Ciclo	Temp (°C)	Tiempo	Repeticiones
Desnaturalización inicial	95	5'	1
Desnaturalización	95	3''	
Hibridación	65	1''	40
Extensión	72	1'	
Extensión final	72	5'	1
Mantenimiento	4	∞	

Los productos amplificados fueron analizados por electroforesis en geles de agarosa al 2% en Tampón TAE 1X (Tris base 40mM; Ácido Acético glacial; EDTA 2mM; pH 8) conteniendo 1µl de SYBR-safe™ DNA por cada 10 mL de TAE. Luego se procedió a la siembra de 4µl de ADN y se realizó la corrida electroforética en una cámara Econo-submarine, modelo 014-02 (CBS, Scientific Company) a 90 voltios durante 45 minutos aproximadamente. Finalmente, se visualizó el gel en el transluminizador Uvitec®. Se realizó el registro fotográfico.

4.4. Estudio del comportamiento parasitológico del aislado AM-16 de *T. cruzi* en ratones NMRI.

Con la finalidad de determinar si la vía de administración o puerta de entrada del aislado AM-16 de *T. cruzi*, ejercía algún efecto sobre su comportamiento parasitológico en ratones

NMRI, se ensayaron tres vías de inoculación: vía oral-mucosa bucal (MB), vía oral-mucosa gástrica (MG), y vía intraperitoneal (IP).

De esta manera, un total de 23 ratones fueron divididos en tres grupos de acuerdo a la vía de administración e inoculados con 2×10^5 tripomastigotes/ratón. Los tripomastigotes empleados para preparar los inóculos se obtuvieron de tres ratones previamente infectados como se describe a continuación: un ratón con 20 a 24 días de infección fue sacrificado por sobredosis en cámara de cloroformo. Inmediatamente se llevó a cabo su disección retirando la piel y dejando expuesta la cavidad abdominal, donde se realizó un pequeño corte en forma de ojal a fin de hacer un lavado intraperitoneal por este orificio. Se utilizó una pipeta Pasteur instilando un volumen de 1 a 1,5 mL de PBS estéril dentro de la cavidad y se le dio un ligero masaje. A continuación se extrajo el líquido peritoneal y se colocó en tubos de 15 mL, este lavado se realizó dos veces más. La concentración de tripomastigotes en el exudado obtenido, se calculó realizando el conteo en la cámara de Neubauer© (N° tripomastigotes/ml de suspensión). Finalmente se preparó la dosis de parásitos deseada (2×10^5 tripomastigotes/ratón) en el volumen de PBS requerido para cada grupo y de acuerdo al número de animales/grupo (ver en los siguientes apartados).

4.4.1. Infección experimental de los ratones por vía oral: mucosa bucal.

El primer grupo estuvo conformado por 8 ratones. Cada animal fue inoculado con 2×10^5 tripomastigotes en 0,05mL de PBS por vía oral-mucosa bucal, mediante el uso de una cánula adaptada a una jeringa. Para ello se inmovilizó al ratón sujetándolo con la mano a fin de administrar la suspensión de parásitos por vía oral y solamente en la cavidad bucal. Se suministró el volumen de suspensión gota a gota y lentamente, colocando el extremo de

la cánula dentro de la cavidad oral, procurando el contacto de la suspensión de parásitos con la mucosa bucal (mejillas, base de la lengua). Durante la administración se le permitió al ratón tragar la suspensión.

4.4.2. Infección experimental de los ratones por vía oral: mucosa gástrica.

El segundo grupo estuvo constituido por 8 ratones, igualmente inoculados con 2×10^5 tripomastigotes/ratón en un volumen de 0,20 mL/ratón. La suspensión de parásitos fue administrada por vía oral directamente en la mucosa gástrica. Para ello se sujetó al ratón y se introdujo completamente una cánula igual a la descrita en el apartado anterior, descargando la suspensión a nivel del estómago.

4.4.3. Infección experimental de los ratones por vía intraperitoneal.

El tercer grupo formado por 7 ratones fue inoculado con 2×10^5 tripomastigotes/ratón contenidos en 0,20 mL de suspensión e inyectados en la cavidad abdominal de cada animal.

4.4.4. Evaluación parasitológica de los ratones infectados por las distintas vías de inoculación.

Se determinó la parasitemia y la concentración de parásitos en la cavidad abdominal. Ensayos parasitológicos de sensibilidad creciente se aplicaron en caso de resultar negativos a las dos anteriores (ver mas adelante apartado 4.5.8). La mortalidad de los ratones fue monitoreada diariamente hasta el final del ensayo (45d.p.i.).

4.4.5. Evaluación de la parasitemia.

La parasitemia de los ratones de los tres grupos (MB, MG e IP) fue evaluada por el método de Brener (Brener y col., 1962), durante la fase aguda de la infección, dos veces por semana a partir del día 7 hasta el día 45 p.i. Se llevó a cabo de la siguiente manera: se cortó la punta de la cola del ratón y la sangre fue colectada en un capilar de 5 μ L, se colocó sobre una lámina portaobjeto y cubrió con una lámina cubreobjetos de 22x22 mm, resultando una mono capa de células distribuida uniformemente. A continuación, empleando el microscopio óptico, se cuantificó el número de parásitos presentes en 100 campos microscópicos usando el objetivo de 40X. El número de parásitos resultante se multiplicó por el factor del microscopio, calculado previamente, a fin de obtener el número de tripomastigotes/mL de sangre, relación que corresponde a la parasitemia.

Con los datos obtenidos se construyó la curva de parasitemia (Nº parásitos/mL sangre vs. tiempo), empleando el valor promedio \pm desviación estándar del grupo/día. La sensibilidad de este método es de 2.000 a 20.000 parásitos (Sanoja, 2001).

4.4.6. Cuantificación de tripomastigotes en la cavidad abdominal de los ratones durante la fase aguda.

Con la aplicación de esta metodología se pretendió estimar las variaciones en la cantidad de parásitos presentes en la cavidad abdominal a lo largo de la fase aguda. Así mismo, comparar en el tiempo, la aparición de los tripomastigotes en esta cavidad con respecto a los tripomastigotes sanguíneos. Esta evaluación se llevó a cabo a partir del día 7 post infección, dos veces por semana durante 45 días. Para obtener el exudado peritoneal, se utilizó la metodología descrita en el apartado 4.2.2. Finalmente se determinó el número de parásitos/mL realizando el conteo de cámara de Neubauer. Los datos fueron tabulados y

graficados en función del número de tripomastigotes/ml de exudado peritoneal vs tiempo. Para ello se utilizaron los valores promedio \pm desviación estándar del grupo/día.

4.4.7. Determinación de la presencia de parásitos en sangre mediante por el método del hematocrito.

Aquellos ratones cuya parasitemia fue negativa o con ausencia de parásitos en la cavidad abdominal durante toda la fase aguda, fueron evaluados por un método parasitológico de mayor sensibilidad, el hematocrito. Para ello, se colectaron aproximadamente 30 μ L de sangre de la cola de ratón usando un microcapilar heparinizado. Se centrifugó en una centrifuga para hematocrito (4223 Centrifuge®) a 1.290g. durante 10 minutos a temperatura ambiente. A continuación, se aisló la interfase (“buffy coat”), entre el plasma y los glóbulos rojos, esta se examinó en el microscopio óptico con el objetivo de 40X para detectar los tripomastigotes presentes en la interface. La sensibilidad de este método es mayor o igual a 300 tripomastigotes/mL (Sanoja, 2001).

4.4.8. Coloración de las muestras por el método de Giemsa.

Durante la fase aguda de la infección experimental, se realizaron extendidos del exudado peritoneal de algunos ratones a diferentes tiempos. y fueron teñidos utilizando la coloración de Giemsa (marca comercial Riedel-DeHaëin). Una vez secos, las láminas fueron fijadas con metanol y coloreadas durante 25 minutos utilizando una dilución 1:20 de la solución de Giemsa en agua destilada. A continuación se lavaron con agua de chorro y se dejaron secar

a temperatura ambiente. Esto permitió observar la morfología de los tripomastigotes y otras formas presentes en la cavidad abdominal, así como la presencia de macrófagos y otras células parasitadas o no con amastigotes y/o tripomastigotes. Se llevó a cabo el registro fotográfico.

4.5. Evaluación histológica de la mucosa bucal y gástrica de ratones NMRI infectados con *Trypanosoma cruzi* AM-16 por vía oral-mucosa bucal.

Con la finalidad de estudiar la cavidad bucal y la mucosa gástrica como puertas de entrada de los tripomastigotes, un grupo de ocho ratones, fue infectado por vía oral en la mucosa bucal con 2×10^5 parásitos/ratón, de acuerdo a la metodología descrita en el apartado 4.5.1. Se llevaron a cabo estudios histológicos para evidenciar la penetración y colonización de *T. cruzi* AM-16, posibles alteraciones en los tejidos de mejillas (carrillos), lengua y estómago y focos de infiltrado celular inflamatorio (ICI) debidos a la presencia del parásito.. Tejidos de las mejillas, lengua y estómago de un ratón sano fueron procesados como control negativo del experimento. Los ratones infectados, fueron sacrificados por sobredosis en cámara de cloroformo a las 4, 24, 48 y 72 horas p.i., a razón de dos ratones por cada tiempo de estudio.

Para extraer los tejidos de la cavidad bucal, una vez sacrificado el ratón correspondiente, este fue decapitado e inmediatamente se removieron los pelos, piel, bigotes y orejas, dejando expuesta la musculatura. A continuación, se colocó la cabeza completa en formalina al 10%. Seguidamente se disectó la cavidad abdominal para extraer el estómago y tras varios lavados en un vidrio de reloj conteniendo PBS, para eliminar los restos

alimenticios, se colocó en formalina al 10%. El ratón sano (control negativo) fue procesado de igual forma para extraer los tejidos correspondientes.

Las muestras obtenidas fueron procesadas histológicamente como se describe a continuación:

Fijación y deshidratación: cada muestra se conservó en formalina al 10% por 7 días a 4°C. Transcurrido este tiempo las cabezas de los ratones infectados y control, fueron disectadas bajo la lupa para extraer las mejillas y lengua antes de comenzar el proceso de deshidratación. Cada muestra fue deshidratada en una batería de alcoholes de concentración ascendente, 70%, 96% y 100%, permaneciendo 30 minutos a temperatura ambiente en cada solución.

Aclarado e inclusión: la muestra fue transferida a un recipiente conteniendo una solución de tolueno donde permaneció por 30 minutos a temperatura ambiente en una campana de extracción. Luego se colocó en un molde y se agregó parafina líquida, se mantuvo en la estufa por una hora a 56°C. Este último proceso se repitió de nuevo en otro molde y se dejó durante una hora a 56°C. A continuación se retiraron los moldes de la estufa y permanecieron a temperatura ambiente por 24 horas.

Corte: el bloque sólido de parafina se cortó en secciones de 5µm de grosor, dejando entre uno y otro 15µm. La lengua se cortó desde la base hacia adentro, las mejillas y el estómago desde la región interna del órgano hacia la externa, para ello se empleó un microtomo (®LEICA).

Desparafinación y rehidratación: la parafina se eliminó con xilol, (solvente orgánico) colocándose el taco de parafina por 30 minutos a 37°C, proceso que se repitió dos veces.

Seguidamente se rehidrataron los tejidos en una batería de alcoholes de concentración descendente (etanol 96, 70 y 50%) por 5 minutos en cada solución. Por último se sumergieron en agua destilada y agua corriente un minuto cada vez.

Coloración: se emplearon frascos coplin para la coloración con Hematoxilina-Eosina (H/E). Los portaobjetos con los cortes se sumergieron en una cubeta con hematoxilina por 1 minuto y medio. Se lavaron con agua corriente por 2 minutos y luego en alcohol al 50% durante 30 segundos. A continuación fueron sumergidos en eosina por 1 minuto y luego en soluciones de etanol creciente al 70, 96 y 100% por 1 minuto cada vez (lavado). Se transfirieron a xilol por 1 minuto (aclarado). Finalmente se cubrieron los cortes con un cubreobjetos que se fijó con un medio de montaje permanente dejándose secar por 24 horas a temperatura ambiente.

Los cortes de tejido se observaron al microscopio óptico a diferentes aumentos para su evaluación y se realizó un registro fotográfico.

4.6. Análisis estadístico.

Los datos de los ensayos expresados como la media \pm desviación estándar (DS), fueron analizados con el programa GraphPad Prism 5. Para comparar la media de los grupos se utilizó la prueba ANOVA de una cola y el test de Bonferroni.

5. RESULTADOS

El mantenimiento del ciclo experimental del flagelado *Trypanosoma cruzi* en el modelo murino, implica por lo general de una rutina en la cual el pasaje de tripomastigotes sanguíneos de ratones infectados a ratones sanos, se realiza mediante la inoculación por vía intraperitoneal de una suspensión de parásitos. Este pase ratón-ratón es comúnmente denominado repique. En cepas de *T. cruzi* de referencia internacional, como por ejemplo la cepa “Y”, el comportamiento parasitológico del flagelado es muy similar entre animales de un mismo grupo, infectado bajo las mismas condiciones, pudiéndose determinar con bastante precisión los días más indicados para realizar los repiques y mantener de esta forma el ciclo experimental de *T. cruzi* en el modelo murino. Por lo general, solo se verifica la presencia de los tripomastigotes sanguíneos en el ratón infectado mediante examen microscópico directo, se hace un estimado de la carga parasitaria y se prepara una suspensión de parásitos en PBS o en solución salina, es decir no se cuantifica el número de parásitos inoculados.

En este sentido, en los últimos años en el laboratorio de Inmunología y Quimioterapia, hemos mantenido varios aislados venezolanos de *T. cruzi* por la metodología anteriormente descrita (repiques con tripomastigotes sanguíneos), e igualmente mediante la inoculación de tripomastigotes presentes en el exudado intraperitoneal de los ratones (Díaz, 2014). Sin embargo, la variación de respuesta parasitológica observada entre los ratones NMRI de un mismo repique en relación al tiempo de detección del parásito, tanto en sangre como en la cavidad abdominal, nos ha dificultado la realización de los pasajes o repiques, conllevando en algunos casos a la pérdida de las cepas. Este hecho, ha representado un problema para el mantenimiento del ciclo experimental de estos valiosos aislados venezolanos en el

laboratorio y en consecuencia en las investigaciones que llevamos a cabo. Es por esta razón que nos propusimos un objetivo inicial, el cual nos permitió establecer los períodos de detección de los tripomastigotes en los ratones de los repiques, tanto en sangre como en la cavidad abdominal, mediante una evaluación microscópica directa del fluido extraído. Estandarizando así el período apropiado para realizar los pases ratón-ratón y al mismo tiempo determinar los días óptimos en que ratones infectados tendrían mayor posibilidad de poseer una elevada cantidad de parásitos en la cavidad abdominal, los cuales fueron empleados para preparar los inóculos y llevar a cabo los experimentos planteados en los demás objetivos.

5.1 Evaluación parasitológica del insecto triatomino *Panstrongylus* sp. capturado en el sector Santa Ana, El Cafetal, Caracas.

A fin de determinar la presencia de formas flageladas de *T. cruzi* en el insecto hematófago silvestre, se realizó la disección del abdomen y se extrajo el intestino. Este fue colocado en solución salina y el contenido intestinal examinado al microscopio óptico a 400x. Se detectó la presencia de tripomastigotes metacíclicos que sugerían pertenecer a la especie *T. cruzi* de acuerdo a su morfología y tamaño (ver figura 4).

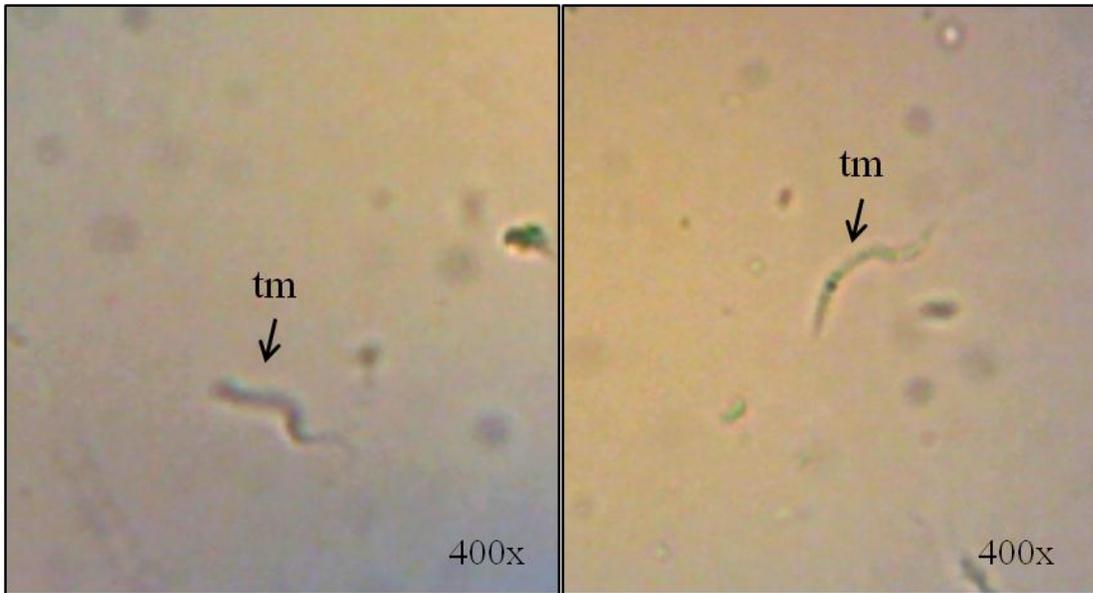


Figura 4. Formas de *Trypanosoma cruzi* aislado AM-16, presentes en el contenido intestinal de *Panstrongylus* sp. silvestre.

Las flechas señalan los tripomastigotes metacíclicos (tm). Aumento total 400X. Parásitos en solución salina, sin teñir.

5.2. Establecimiento del ciclo experimental de *T. cruzi* AM-16 en el modelo ratón NMRI-*Rhodnius prolixus* y caracterización parasitológica del aislado.

El examen microscópico de las muestras de sangre extraídas de los dos ratones inoculados con tripomastigotes metacíclicos del chipo, reveló la presencia de tripomastigotes en uno de los ratones a los 11 d.p.i. En el otro ratón no se detectaron parásitos durante la evaluación.

5.2.2. Mantenimiento del aislado AM-16 mediante pases ratón-ratón.

Una vez establecida la infección de *T. cruzi* AM-16 en ratones NMRI, se determinó el período prepatente en los ratones de los repiques, tanto en sangre como en cavidad abdominal. Distintos grupos de ratones fueron infectados con: 1) tripomastigotes sanguíneos y 2) tripomastigotes obtenidos de la cavidad abdominal.

En el primer caso, como se muestra en la tabla 4, se observó una notable variación de respuesta parasitológica entre los ratones de los cuatro repiques, con respecto a la detección de parásitos. El período prepatente, estuvo entre 9 a 16 días post infección en sangre y cavidad abdominal, promedio 12 y 13 d.p.i., respectivamente. Se observó variabilidad en el porcentaje de ratones positivos a parásitos dentro de un mismo grupo experimental (repique) y entre un repique a otro. El promedio de positividad en sangre fue 56% y en el exudado peritoneal 75% (ver tabla 4). Se detectaron parásitos hasta el día 27 p.i. tanto en sangre como en cavidad abdominal.

Tabla 4. Evaluación parasitológica de ratones inoculados con tripomastigotes sanguíneos de *T cruzi*. AM-16: pases ratón-ratón.

EVALUACIÓN PARASITOLÓGICA: EXÁMEN MICROSCÓPICO DIRECTO				
REPIQUE	tripomastigotes sanguíneos		tripomastigotes en exudado peritoneal	
	ratones positivos (%)	período prepatente (d.p.i)	ratones positivos (%)	período prepatente (d.p.i)
n=4	50	10	50	10
n=4	25	9	50	13
n=4	50	16	100	16
n=2	100	13	100	13
PROMEDIO	56	12	75	13

n: número de ratones por repique; d.p.i: días post-infección

La tabla 5 muestra los resultados de la evaluación parasitológica de los ratones de los tres pases o repiques realizados con tripomastigotes obtenidos de la cavidad abdominal. Se observó variabilidad en la detección de tripomastigotes sanguíneos dentro de un mismo repique y entre un grupo a otro, con un promedio de 42% de positividad (tabla 5). Así mismo, también se observaron variaciones entre los ratones de los tres repiques al evaluar

el exudado de la cavidad peritoneal (ver tabla 5). El período prepatente promedio fue de 13 d.p.i tanto en sangre como en cavidad abdominal y se detectaron tripomastigotes hasta los 27 días de evaluación.

Tabla 5. Evaluación parasitológica de ratones infectados con tripomastigotes de *T. cruzi* AM-16, extraídos de la cavidad peritoneal: pases ratón-ratón.

EVALUACIÓN PARASITOLÓGICA: EXÁMEN MICROSCÓPICO DIRECTO				
REPIQUE	tripomastigotes sanguíneos		tripomastigotes en exudado peritoneal	
	ratones positivos (%)	período prepatente (d.p.i)	ratones positivos (%)	período prepatente (d.p.i)
n=4	25	8	25	8
n=2	50	16	100	16
n=4	50	15	100	15
PROMEDIO	42	13	75	13

n: número de ratones por repique; d.p.i: días post-infección

5.2.3. Mantenimiento de *T. cruzi* aislado AM-16 en *Rhodnius prolixus*: xenodiagnóstico.

Ninfas del III y IV estadio de desarrollo de *R. prolixus* fueron alimentadas con sangre de ratones infectados con *T. cruzi* AM-16. Posteriormente, se realizó el examen microscópico de las heces de estos insectos, a fin de detectar la presencia de tripomastigotes metacíclicos para el mantenimiento del ciclo experimental.

La evaluación microscópica de las heces de los chipos resultó positiva a parásitos para el primer xenodiagnóstico a los 60 días luego de la alimentación y para el segundo a los 30 días. La figura 5 muestra las formas flageladas encontradas, tripomastigotes metacíclicos (figura 5A) y epimastigotes (figura 5B).

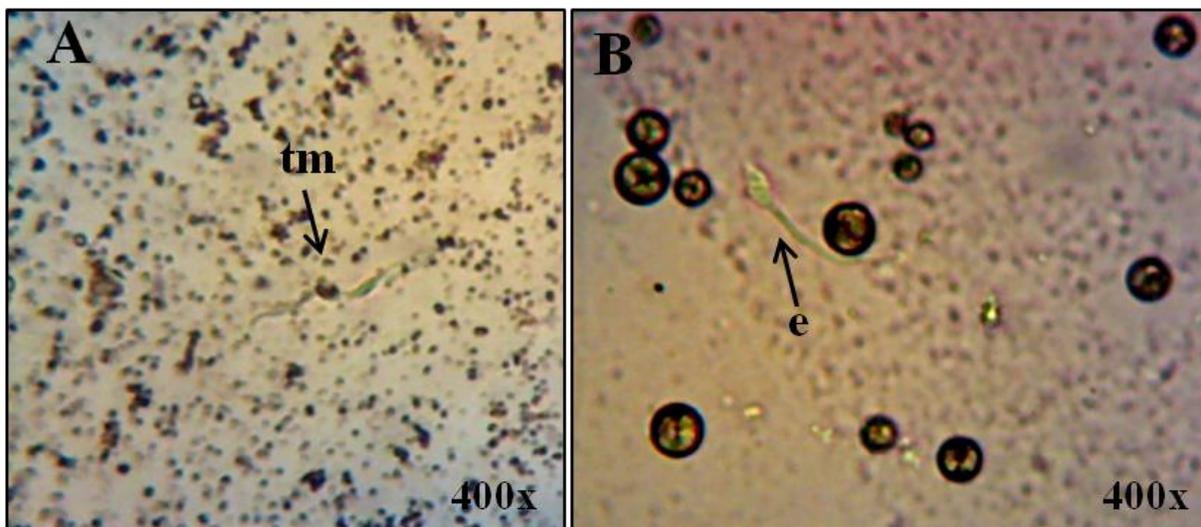


Figura 5. Formas de *T. cruzi* AM-16 detectadas en el contenido intestinal de *R. prolixus* (xenodiagnóstico).

A. tripomastigote metacíclico (tm); **B.** epimastigote (e). Aumento total: 400X. Parásitos en solución salina, sin teñir. Las flechas señalan los flagelados.

Los ratones infectados con la suspensión parásitos provenientes de las heces de *R. prolixus*, presentaron tripomastigotes sanguíneos a los 11 días post infección, completando así el ciclo experimental.

5.3. Diagnóstico molecular del aislado AM-16 en el taxón especie *Trypanosoma cruzi*.

En la figura 6 se muestra el resultado de la evaluación molecular por PCR (Moser y col., 1989) de las muestras de sangre y exudado intraperitoneal de ratones infectados con el aislado AM-16. Las muestras fueron colocadas en los carriles en el siguiente orden:

1-:marcador de peso molecular 1kb plus (100pb), 2- ADN total de exudado peritoneal de ratón infectado con aislado AM-16., 3- ADN total de sangre de ratón infectado con aislado AM-16, 4-ADN de cultivo de *T. cruzi* cepa CL-Brener (control positivo) y carril 5: agua (control negativo). En las dos muestras evaluadas se observa la amplificación de la banda de 188pb, correspondiente a la especie *Trypanosoma cruzi*.

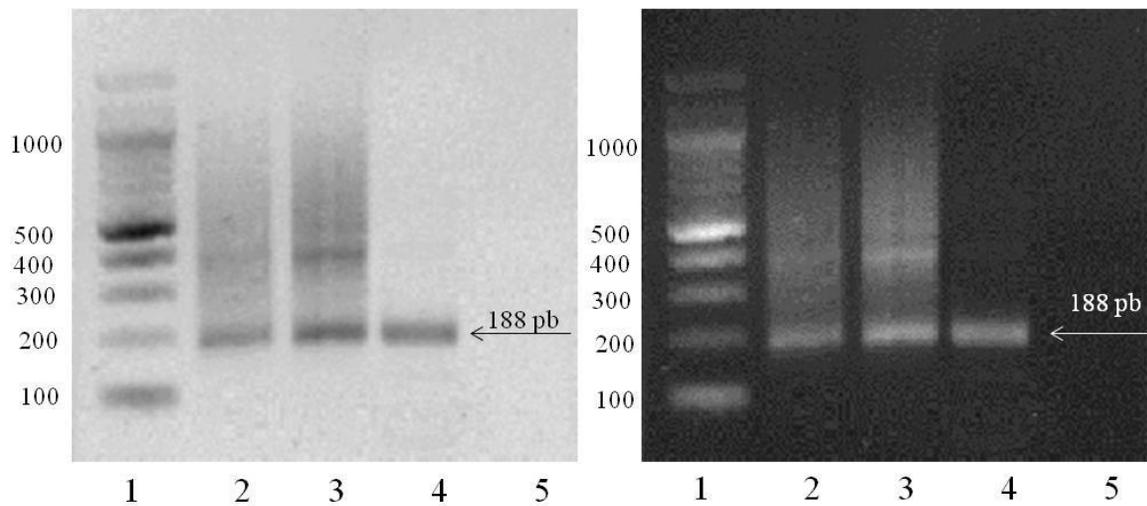


Figura 6. Diagnóstico molecular del aislado AM-16 en el taxón especie *Trypanosoma cruzi* mediante PCR.

Carril 1: Marcador de peso molecular 1kb plus (100pb); Carril 2: ADN total de exudado peritoneal de ratón infectado con aislado AM-16; Carril 3: ADN total de sangre de ratón infectado con aislado AM-16; Carril 4: ADN de *T. cruzi* cepa CL-Brener (control positivo); Carril 5: agua (control negativo). La flecha indica la banda de 188 pb correspondientes a una región de la molécula de ADN de *T. cruzi*.

5.4. Evaluación parasitológica del efecto de la vía de inoculación de *Trypanosoma cruzi* AM-16 en ratones NMRI.

Con la finalidad de determinar si la vía de inoculación del parásito ejercía algún efecto sobre su comportamiento parasitológico en ratones NMRI, se ensayaron diferentes vías de administración de los tripomastigotes. A continuación se muestran los resultados de las pruebas parasitológicas aplicadas.

5.4.1. Evaluación de la sobrevivencia.

La figura 7 muestra los resultados de la evaluación de la sobrevivencia de los ratones de cada grupo durante la fase aguda evaluada (46 días). La mortalidad de los ratones se observó en todos los grupos experimentales. Los porcentajes de sobrevivencia fueron:

MB 75% > MG 50% > IP 42,85%. Como se observa en la figura 7, los primeros animales de los tres grupos experimentales, murieron a los 8 d.p.i. (12,5% de mortalidad) correspondiendo al grupo infectado en la mucosa bucal, duplicándose este porcentaje a los 15 d.p.i. y manteniéndose constante hasta el final de la evaluación (ver figura 7). A los 9 d.p.i. se observó mortalidad en el grupo infectado en la cavidad gástrica (12,5%), aumentando progresivamente hasta alcanzar el 50% a los 27 d.p.i. y manteniéndose sin variaciones hasta el final de la evaluación. Los valores de sobrevivencia del grupo IP fueron similares al grupo MG al final de la evaluación, sin embargo, se observó un retraso en la mortalidad del grupo IP, registrándose las muertes entre los días 27 y 40 post infección(figura 7).

En todos los ratones de los tres grupos se observaron signos externos de la infección aguda (ver más adelante apartado 5.4.3).

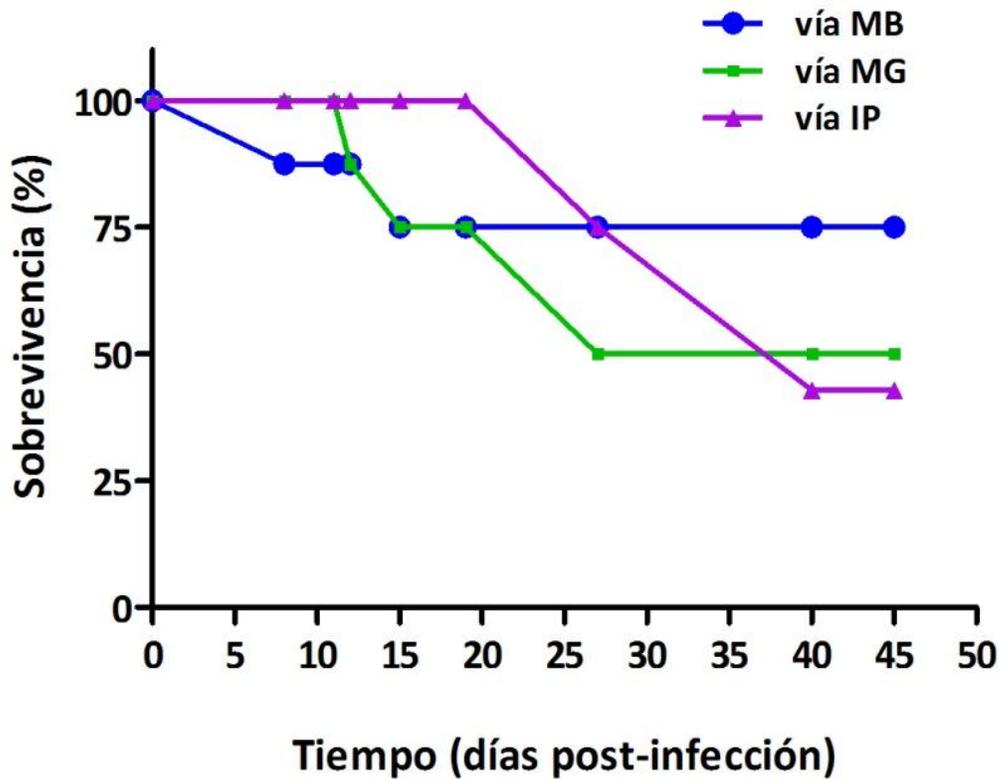


Figura 7. Sobrevivencia de ratones infectados con 2×10^5 parásitos/ratón de *T. cruzi* aislado AM-16, a través de diferentes vías de inoculación.

MG: mucosa gástrica (n=8); MB: mucosa bucal (n=8); IP: intraperitoneal (n=7).

5.4.2. Evaluación de la parasitemia.

La figura 8 representa la parasitemia de los grupos de ratones infectados por distintas vías de inoculación, obtenida por el método de Brener. En el gráfico se observa que los ratones del grupo infectado por vía IP fueron los primeros en presentar parasitemia (día 8 p.i.). Mientras que en los otros dos grupos, MB y MG, se detectaron tripomastigotes sanguíneos

a los 12 días post infección. Cabe mencionar que en el grupo MB solo uno de los ocho ratones infectados presentó parásitos (12 d.p.i.), luego no mostró parasitemia al igual que el resto del grupo hasta el final de la evaluación. Por el contrario, en el grupo MG se observó un rápido incremento en la parasitemia, alcanzando el valor máximo a los 15 d.p.i. (57.230 parásitos/mL de sangre), representando este el mayor número de tripomastigotes sanguíneos detectado entre los animales de los tres grupos de ratones. A continuación se observó una disminución brusca en la curva de parasitemia del grupo MG hasta el día 44 p.i. (figura 8). El 62,5% de los ratones de este grupo presentaron parasitemia. Finalmente, se puede observar que la parasitemia del grupo IP, aunque mostró valores bajos con respecto a los otros grupos, se mantuvo detectable a lo largo de la evaluación hasta el día 36 p.i., cuando alcanzó su valor máximo para luego disminuir hasta ser indetectable (44 d.p.i). En este grupo 100% de los ratones mostraron parásitos en sangre.

El análisis estadístico al comparar los valores promedio de parasitemia entre los tres grupos para cada día de evaluación, demostró diferencia estadísticamente significativa a los 26 y 29 d.p.i. (Anova 1 cola y test de Bonferroni, $p=0,0231$ y $p=0,0152$, respectivamente).

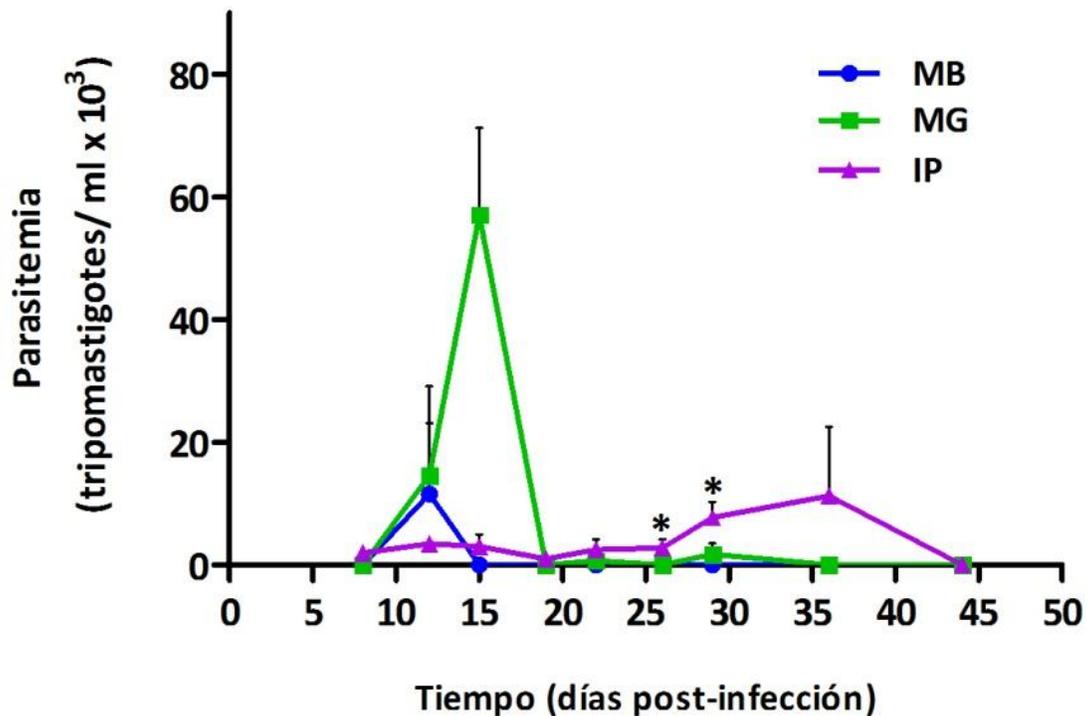


Figura 8. Comparación de la evolución de la parasitemia de los ratones infectados con 2×10^5 parásitos/ratón de *T. cruzi* aislado AM-16, inoculados a través de diferentes vías de administración.

MG: mucosa gástrica; MB: mucosa bucal; IP: intraperitoneal. Se representa la media de la parasitemia de los ratones (\pm EMS) por grupo. El asterisco indica la significancia estadística ($p < 0,05$), Anova 1 cola y test de Bonferroni comparando los valores entre los tres grupos para cada tiempo.

5.4.3. Cinética de tripomastigotes en la cavidad abdominal de ratones infectados con el aislado AM-16 de *Trypanosoma cruzi*.

La cinética de tripomastigotes observada en la cavidad abdominal de los ratones infectados por las distintas vías de inoculación, se muestra en las figuras 9A y 9B. Se observa que a los 9 d.p.i. se detectaron tripomastigotes en el exudado peritoneal de los grupos MG e IP y 4 días después (13 d.p.i.) en el grupo MB. Todos los ratones del grupo IP presentaron

parásitos en la cavidad abdominal, a diferencia de los otros grupos, donde se observaron solo en 12,5% y 37,5% de los ratones MB y MG, respectivamente. Se encontraron diferencias entre los tres grupos con respecto a los valores máximos de concentración de parásitos, tanto en orden de magnitud, como en el día post infección en que fueron detectados. Correspondiendo el día 13 p.i para los grupos MB e IP, con valores máximos de media de 8.571 y 445.714 parásitos/mL de exudado, respectivamente (52 veces mayor IP que MB). El grupo MG presentó un valor máximo el día 36 p.i. de 25.000 parásitos/mL de exudado peritoneal, nótese que ocurre casi al final de la fase aguda, a diferencia de los otros dos grupos.

Las pruebas estadísticas (Anova 1 cola y test de Bonferroni) mostraron diferencias significativas entre las medias de los tres grupos: día 9, $p=0,026$; día 13, $p=0,011$; día 16, $p=0,0005$; día 23, $p=0,0046$; día 27, $p=0,022$; día 30, $p=0,014$ y día 36 $p=0,0001$. Los datos estadísticos (asteriscos) no se muestran en los gráficos.

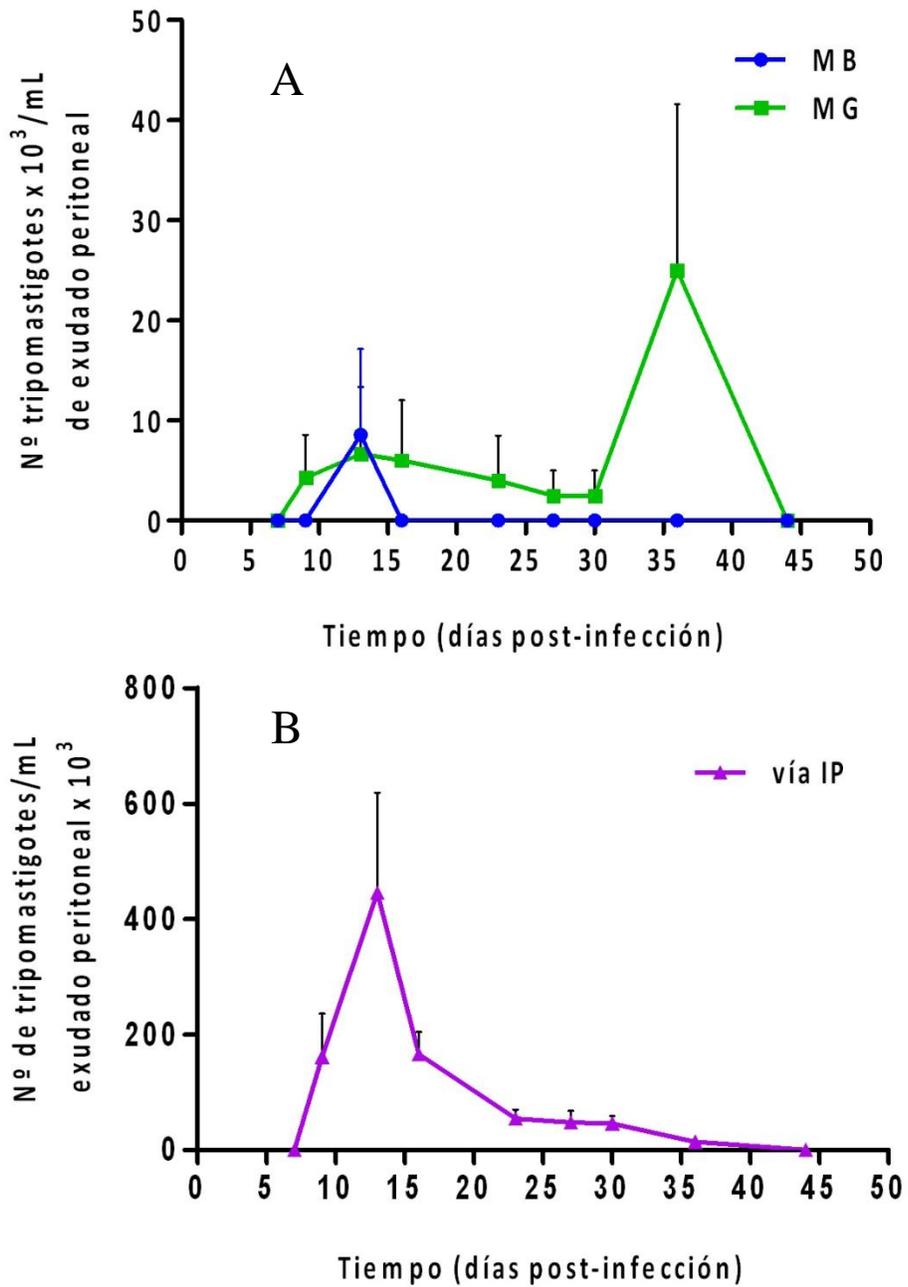


Figura 9. Cinética de tripomastigotes en la cavidad abdominal de ratones infectados experimentalmente por tres vías de inoculación diferentes con el aislado AM-16 de *Trypanosoma cruzi*. A: Grupo infectado vía oral: mucosa bucal (MB) y mucosa gástrica (MG). B: Grupo infectado vía intraperitoneal (IP).

5.4.4. Registro del peso de los ratones infectados por las vías oral y gástrica durante la infección aguda.

Durante la segunda semana de evaluación parasitológica, se observó en los tres grupos de ratones infectados un evidente deterioro en el aspecto externo de los animales, pelo erizado, disminución en sus movimientos y una aparente pérdida de peso corporal. Por lo que se llevó a cabo un registro del peso corporal una vez por semana hasta el final de la evaluación. La figura 10 muestra los resultados de esta evaluación y la comparación del peso de los animales de los tres grupos. El peso promedio de los ratones en los grupos MB y MG disminuyó durante las dos primeras semanas de infección con respecto al valor inicial (día de la infección), aumentando ligeramente para el día 19 p.i., contrariamente el grupo IP aumentó de peso durante este período. En la figura 10 se observa una disminución en el peso de los animales de los tres grupos el día 26 p.i., para luego aumentar en las siguientes semanas. El mayor aumento de peso se registró en el grupo MG sobreviviente durante la fase final de la evaluación.

Las pruebas estadísticas, Anova 1 cola y test de Bonferroni, demostraron diferencias significativas en las medias de los tres grupos en todos los días evaluados, excepto el día 26 p.i. (ver figura 10).

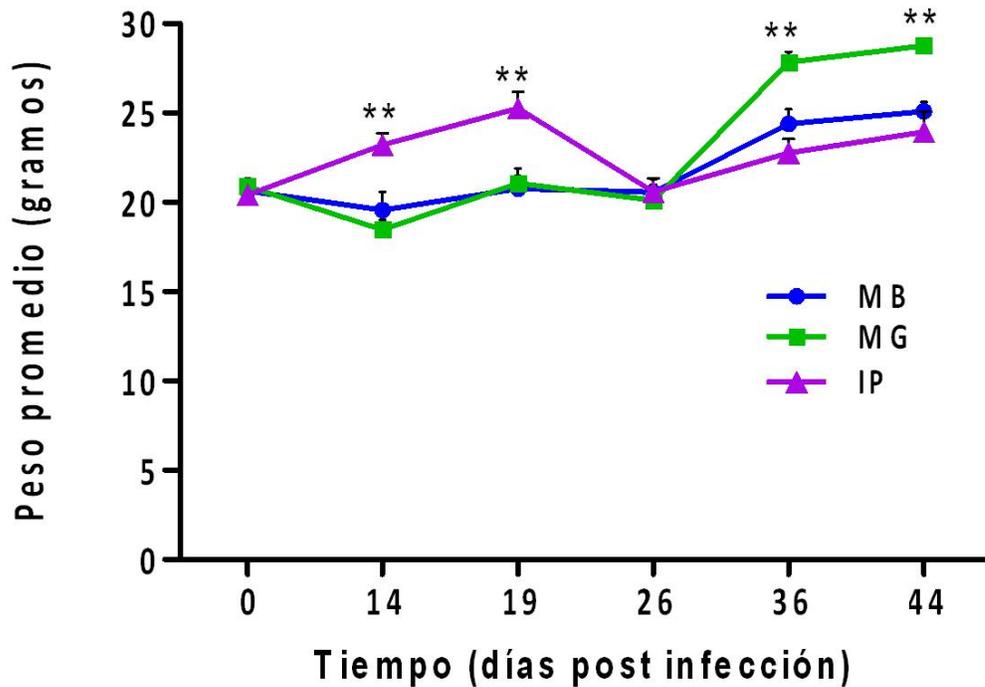
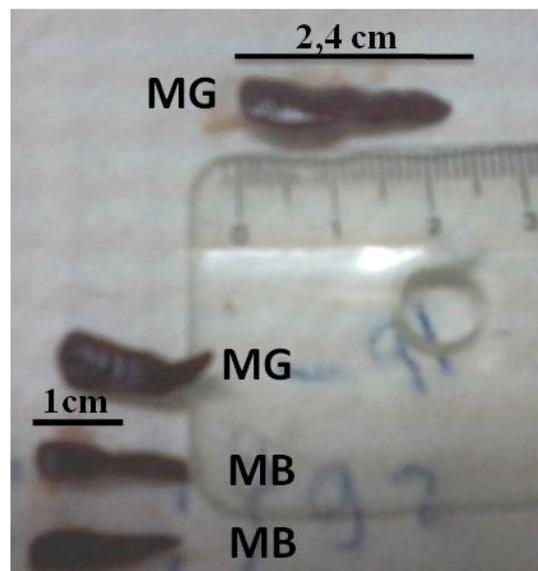


Figura 10. Evaluación del peso corporal de los ratones infectados con *T. cruzi* AM-16 por distintas vías de administración.

MB: mucosa bucal; MG: mucosa gástrica; IP: intraperitoneal. Registro semanal hasta 44 d.p.i. Se representa la media de la parasitemia de los ratones (\pm EMS) por grupo. Los asteriscos indican la significancia estadística ($p < 0,001$), Anova 1 cola y test de Bonferroni comparando los valores entre los tres grupos para cada tiempo.

Al finalizar los experimentos se realizó el sacrificio de los ratones sobrevivientes de los tres grupos. Se realizó la disección de la cavidad abdominal para extraer el bazo a fin de



verificar posible esplenomegalia debida a la infección experimental en aquellos ratones en los que no se habían observado parásitos. Efectivamente, la figura 11 muestra el aumento observado en el tamaño (esplenomegalia) de este órgano en los ratones de los grupos MB y MG, siendo el tamaño del bazo casi dos veces mayor comparado con el bazo de un ratón no infectado de la misma edad (1 a 1,3 cm, no mostrado).

Figura 11. Esplenomegalia detectada en ratones infectados por vía oral con aislado AM-16. MG: mucosa gástrica, MB: mucosa bucal.

5.4.5. Estudio parasitológico del exudado de la cavidad abdominal de los ratones infectados con *T. cruzi* AM-16. Morfología de los tripomastigotes intraperitoneales.

Algunas muestras de exudado peritoneal provenientes de ratones con una elevada cantidad de parásitos, fueron teñidas por el método de Giemsa. En la figura 12 se observan las formas libres de *T. cruzi*. Estas formas presentaron características propias de esta especie de tripanosomatideos tales como: núcleo basófilo en posición central, un flagelo libre en posición posterior y su prominente kinetoplasto cuya coloración se observó fuertemente basófila situado en posición anterior de estos flagelados (figuras 12A, 12B y 12C). Así mismo, se observó la presencia células del sistema inmunológico del hospedador vertebrado tales como, linfocitos y macrófagos.

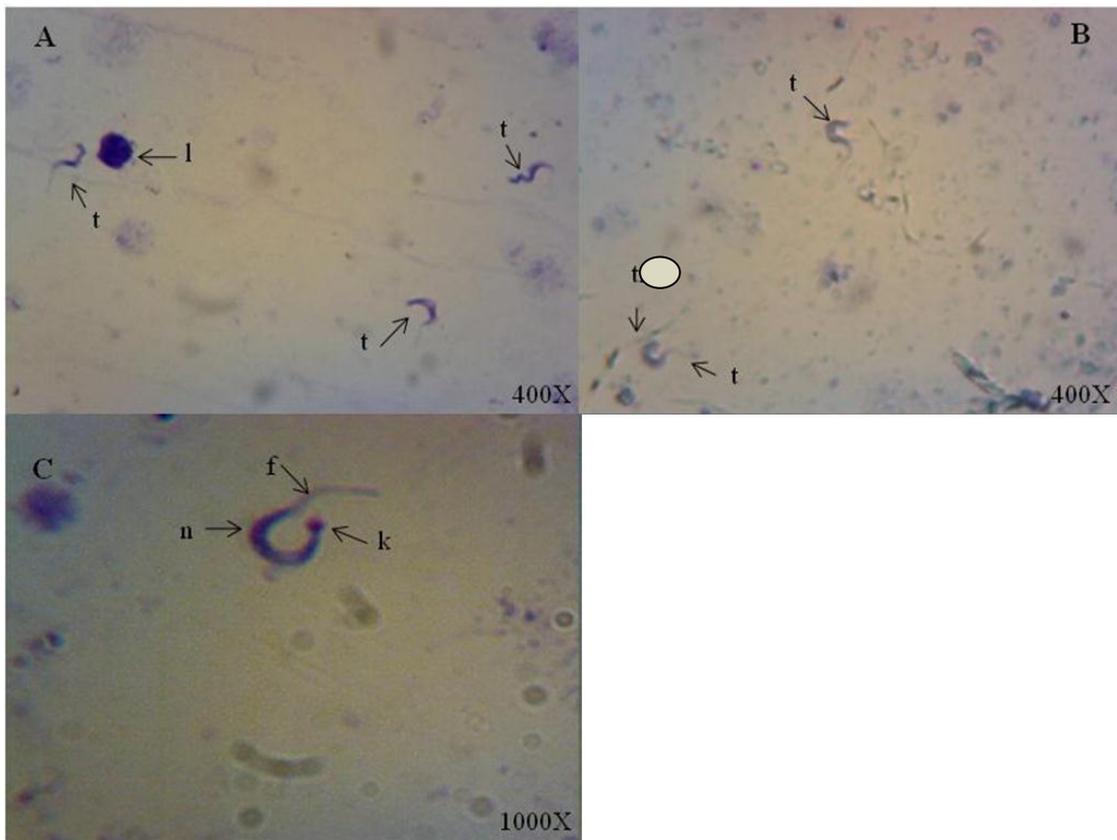


Figura 12. Formas libres de *T. cruzi* aislado AM-16 presentes en el exudado peritoneal de ratones NMRI a los 21 d.p.i.

t: tripomastigote, l: linfocito, f: flagelo libre, n: núcleo, k: kinetoplasto. Tinción con Giemsa. Aumentos: 400X (A-B), 1000X (C-D).

El estudio parasitológico de la cavidad abdominal de los ratones NMRI infectados con el aislado AM-16, evidenció un claro polimorfismo a lo largo de la fase aguda. Durante la primera semana de infección, predominaron las formas tripomastigotes de aproximadamente 15-20 μm de largo (tamaño estimado en relación a los linfocitos presentes), de aspecto sinuoso, con kinetoplasto sobresaliente y distante de la extremidad posterior, flagelo libre con movimientos rápidos y direccionales. Posteriormente, entre los 20 y 27 días post infección, se evidenció predominancia de formas tripomastigotes de un tamaño aproximado de 15mm de largo, con kinetoplasto próximo a la extremidad posterior;

núcleo elipsoide o redondo y de aspecto compacto situado en la región central del parásito, describiendo movimientos en forma de “S” o en “C”, lentos y sin dirección.

Las figuras 13A y 13B muestran macrófagos infectados con amastigotes y tripomastigotes, respectivamente, presentes en el exudado peritoneal a los 21 d.p.i.

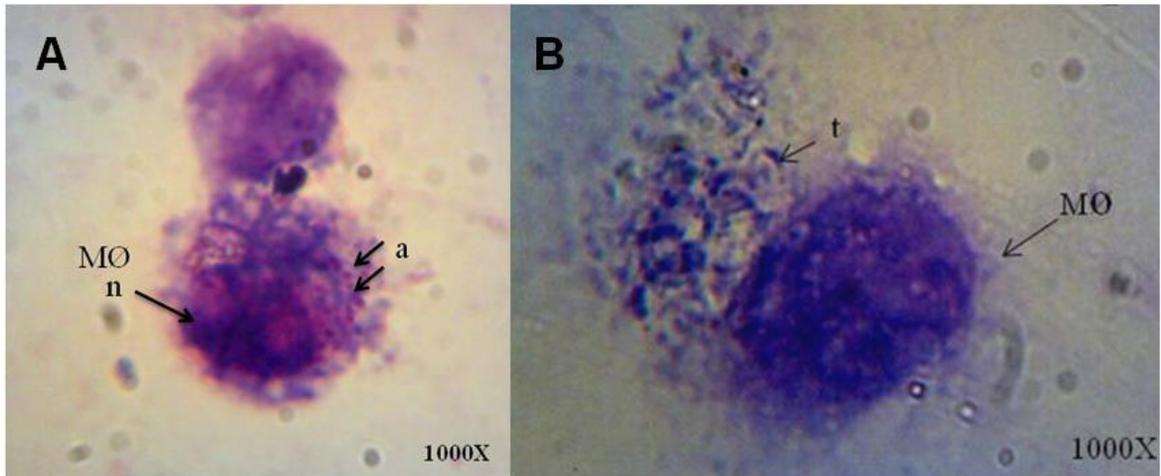


Figura 13. Macrófagos con parásitos intracelulares detectados en muestras de exudado peritoneal de ratones infectados con *T. cruzi* aislado AM-16 a los 21 d.p.i.

A. Macrófago con amastigotes intracelulares. **B.** Macrófago con tripomastigotes intracelulares. MØ: macrófago, n: núcleo de macrófago, a: amastigotes. Tinción con Giemsa. Aumento: 1000X.

5.4.6. Estudio de la penetración y colonización del aislado de *T. cruzi* AM-16 en tejidos de la cavidad bucal

Se realizó la evaluación histopatológica de órganos de la cavidad bucal: lengua, mejillas y estómago de ratones infectados vía oral-mucosa bucal con el aislado *T. cruzi* AM-16. Las muestras se obtuvieron a las 3, 24, 48 y 72 horas post infección. Se pudo detectar la presencia de infiltrado celular inflamatorio (ICI) en el tejido muscular tanto en lengua como en estómago. En la figura 14A se observa el corte histológico de lengua de ratón control sin

ningún tipo de alteraciones en el tejido. Las figuras 14B, 14C y 14D muestran cortes histológicos de lengua de un ratón a las 24 horas post infección, evidenciándose un foco inflamatorio en la región muscular esquelética con abundante ICI.

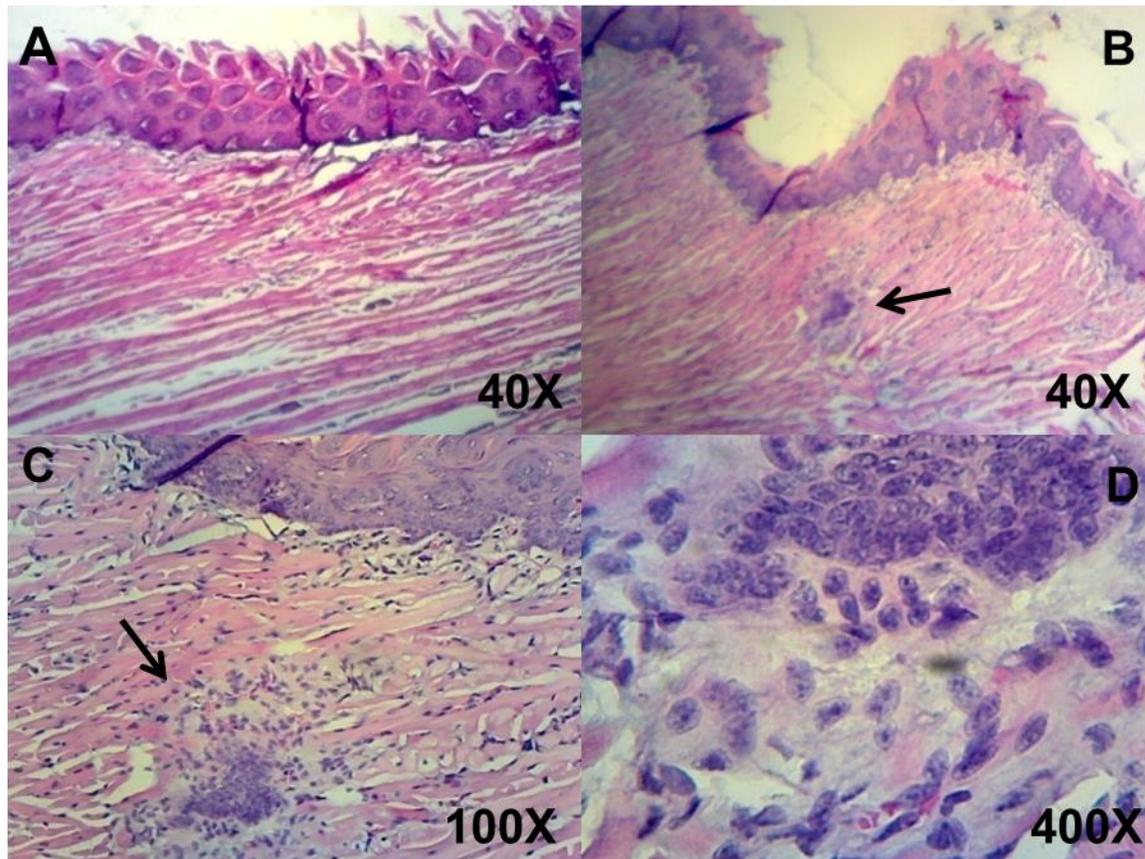


Figura 14. Aspecto histológico del infiltrado celular inflamatorio observado a las 24 horas en lengua de ratón infectado con *T. cruzi* AM-16, vía oral-cavidad bucal.

A. ratón sano (control); **B-D.** ratón infectado. Las flechas señalan el foco inflamatorio en el tejido muscular. Tinción H & E

Las figuras 15B, 15C y 15D corresponden al corte histológico de lengua de ratón con 72 horas de infección, donde se observa un ligero ICI entre las fibras musculares (recuadro figura 14B). A mayor aumento en la figura 15D se observan las células del sistema inmunológico (ICI) de color morado claro. Lo más notable es la alteración en la

continuidad de las fibras musculares, es decir una interrupción de las fibras (señalo con asteriscos en figura 15B). Nótese que el epitelio se encuentra intacto, lo cual descarta algún efecto de la hojilla al haber realizado el corte.

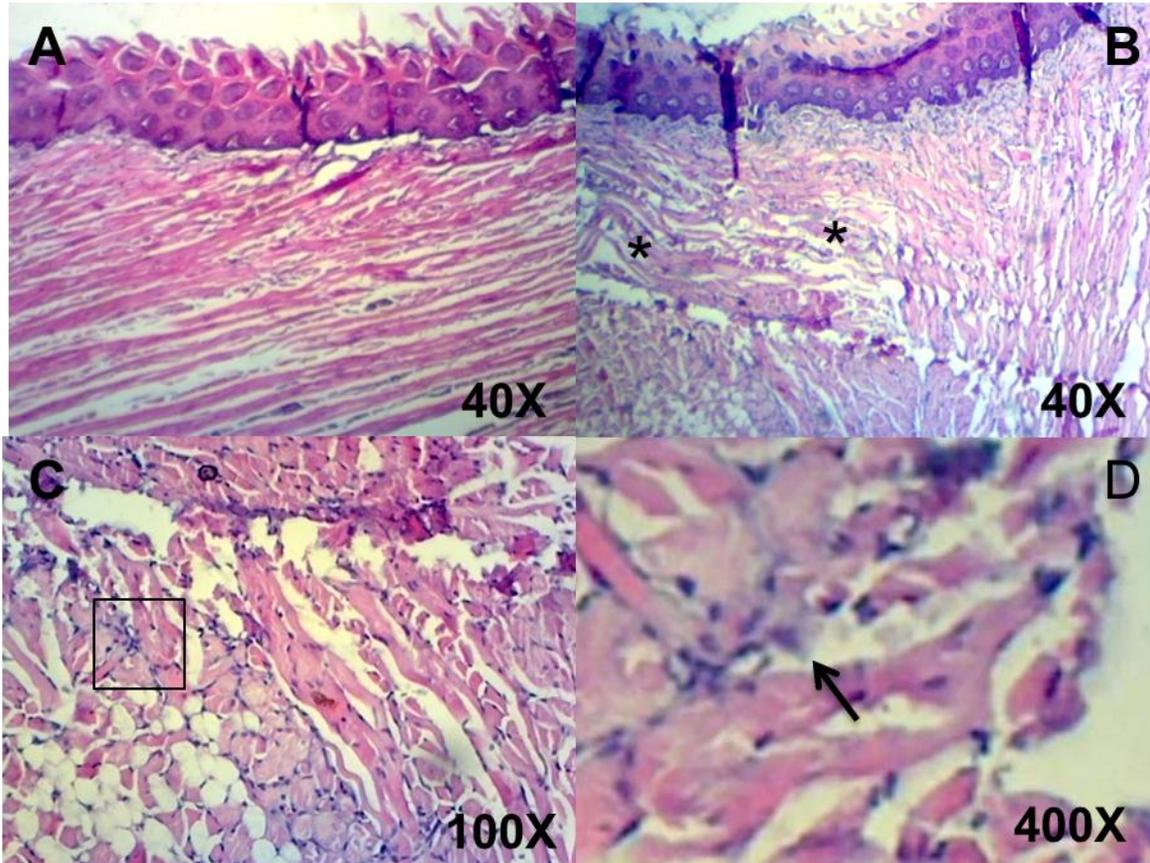


Figura 15. Aspecto histológico del infiltrado celular inflamatorio observado a las 72 horas en lengua de ratón infectado con *T. cruzi* AM-16, vía oral-cavidad bucal.

A. ratón sano (control); **B-D.** ratón infectado. Las flechas señalan el foco inflamatorio observado en el tejido muscular. Se aprecian zonas de discontinuidad y interrupción de las fibras musculares (asteriscos). Tinción H & E

El estudio histológico del estómago, reveló a las 24 horas post infección la presencia de un notable infiltrado inflamatorio en la región pilórica. (figuras 16 B, 16C y 16C).

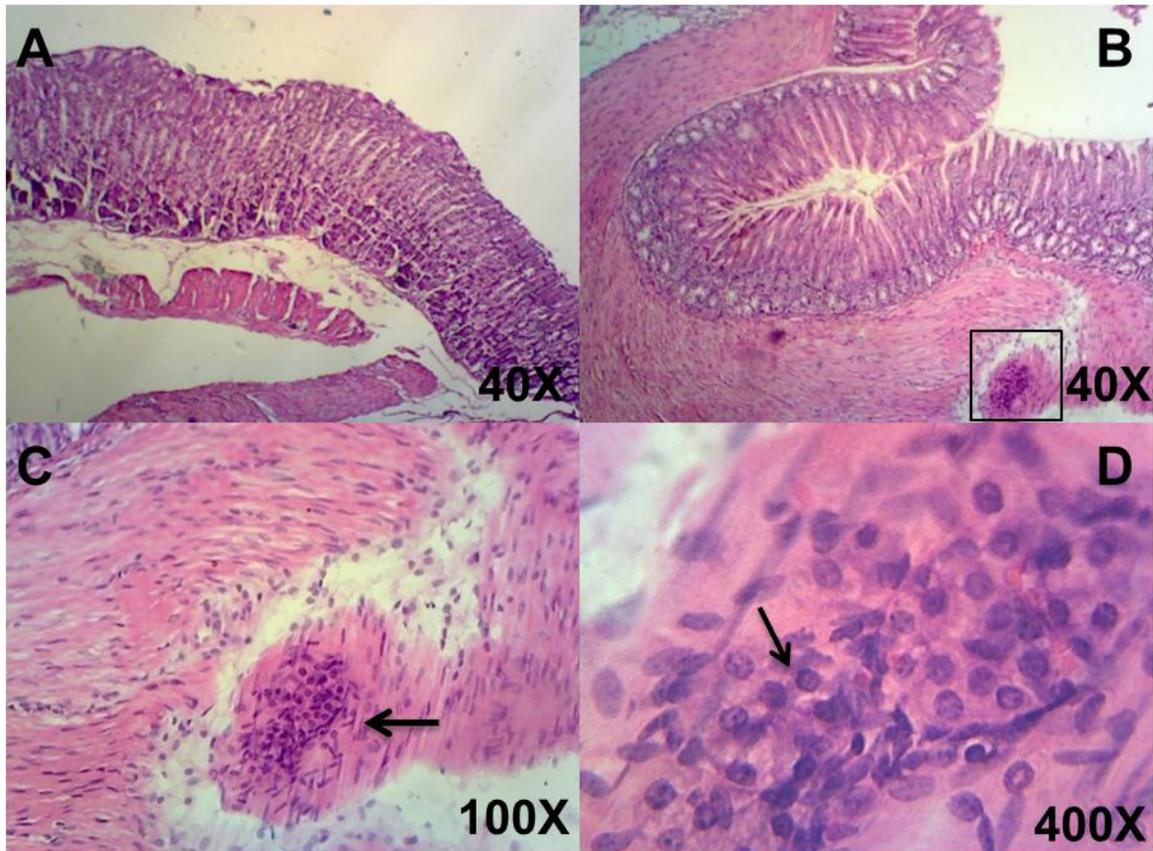


Figura 16. Foco inflamatorio observado a las 24 horas en región pilórica de estómago de ratón infectado con *T. cruzi* AM-16, vía oral-cavidad bucal.

A. ratón sano (control); **B-D.** ratón infectado. El recuadro y la flecha señalan el foco inflamatorio localizado en el tejido muscular. Tinción H & E

Así mismo, en la región fúndica se observa un gran foco inflamatorio en el corte correspondiente a las a las 48 horas p.i (figuras 17B, 17C y 17D). El corte histológico del ratón control se observa en la figura 17A.

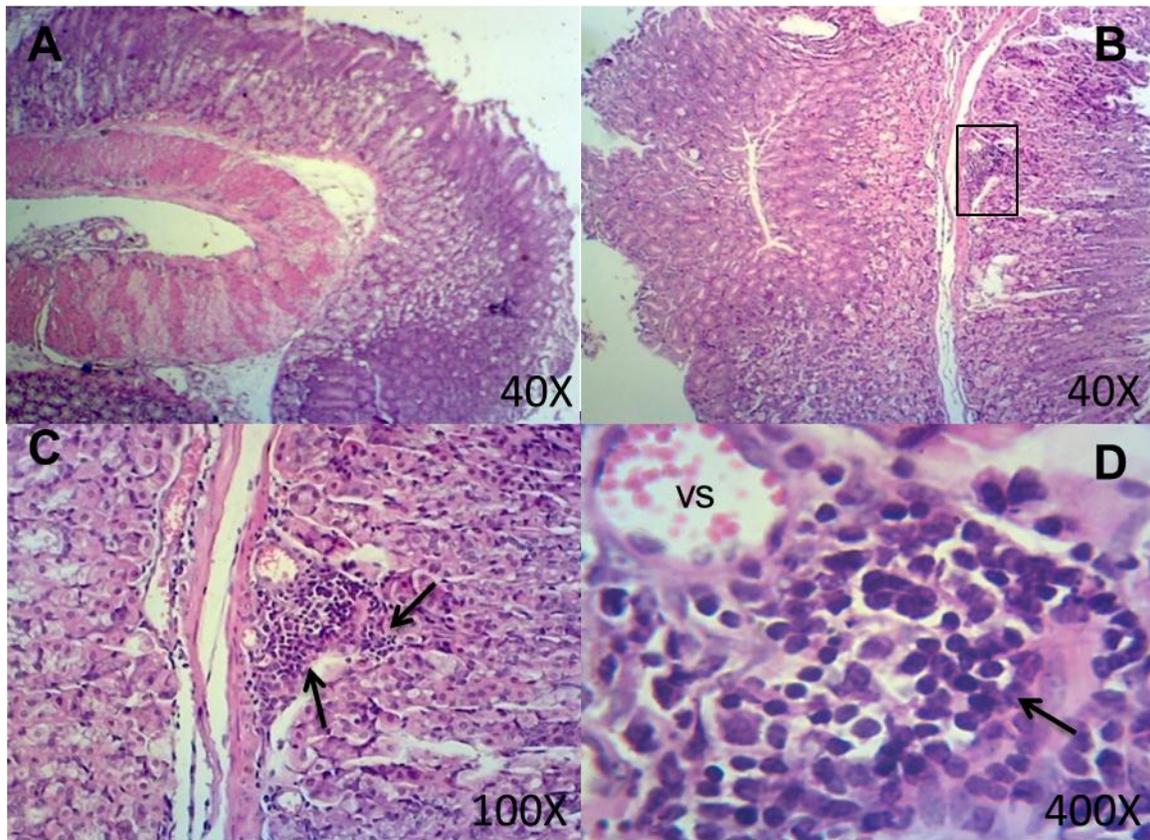


Figura 17. Aspecto histológico del infiltrado inflamatorio observado en región fúndica del estómago de ratón infectado en cavidad bucal con *T. cruzi* AM-16.

A. ratón sano (control); **B-D.** ratón con 48 horas de infección. Las flechas señalan el foco inflamatorio en el tejido muscular; vs: vaso sanguíneo. Tinción H&E

No se detectaron parásitos libres ni nidos de amastigotes en los cortes observados de los tejidos procesados (lengua, mejillas y estómago).

6. DISCUSIÓN

La transmisión oral de *Trypanosoma cruzi* al ser humano, ha pasado a constituir una importante vía de contaminación, dando lugar a la aparición de cientos de casos agudos de la enfermedad de Chagas en varios países de Suramérica, con mayor incidencia en Brasil, Colombia y Venezuela (Tosso y col. 2011; Díaz y González, 2014; Alarcón de Noya y col., 2015) La infección producida por la transmisión oral está caracterizada por una elevada morbilidad, con reportes que datan desde el año 1960 hasta el año 2013, indicando casos fatales durante la fase aguda sobre todo en niños (Rojas y col., 2017). De acuerdo a lo reportado en la literatura, la transmisión oral puede ocurrir como resultado de la ingesta de chips infectados con *T. cruzi* que son accidentalmente triturados junto con los alimentos durante su preparación, así mismo, por el consumo de comida contaminada con heces de chips infectados o bien con secreciones anales de marsupiales (*Opossum*) contaminados y adicionalmente, por el consumo de carne cruda de estos mismos vertebrados silvestres (Díaz y González, 2014, Rojas y col., 2017). Estudios realizados como resultado del abordaje de los brotes de la enfermedad de Chagas producidos por la contaminación de alimentos con *T. cruzi*, han evidenciado un claro aumento en la gravedad de las manifestaciones clínicas en los pacientes, en comparación con las otras rutas de transmisión del parásito (Silva y col. 2017).

En este sentido, investigaciones realizadas sobre la transmisión de *T. cruzi* por vía oral empleando el modelo murino, han demostrado la interacción *T. cruzi* con la mucosa gástrica, evidenciando la participación de glicoproteínas del parásito involucradas en la invasión de este tejido (Hoft y col. 1996; Yoshida, 2009). Así mismo, se han descrito aspectos importantes acerca de la respuesta inmunológica del hospedador y el resultado de

la enfermedad después de la interacción intragástrica, faríngea o bucal del parásito en modelos experimentales (Hoft y col. 1996). Estas evidencias han conllevado a los investigadores al planteamiento de preguntas sobre las características particulares de la entrada de *T. cruzi* a través de la mucosa bucal, tales como la posible modulación de los mecanismos inmunológicos locales y el impacto en la inmunidad regional y sistémica (Silva y col. 2017).

En nuestro trabajo, el estudio parasitológico de ratones infectados por vía oral e intraperitoneal con el aislado AM-16 de *T. cruzi*, reveló la presencia de tripomastigotes libres y parásitos intracelulares (amastigotes y tripomastigotes) en el exudado peritoneal obtenido de la cavidad abdominal de los animales durante la fase aguda. Estos resultados concuerdan con lo reportado por Díaz en el 2014 (Díaz, L, 2014) para los aislados venezolanos de *T. cruzi* MACH-1 y YAGUA y el planteamiento de la cavidad abdominal como un posible reservorio del parásito para evadir la respuesta inmunológica humoral del hospedador (Díaz -Centeno y col., 2013; Díaz-Centeno y col., 2014; Díaz, 2014). Las características morfológicas de los tripomastigotes observados *a posteriori* en el exudado peritoneal de ratones infectados, demostraron que los flagelados aislados inicialmente del insecto silvestre *Panstrongylus* sp., pertenecían a la especie *Trypanosoma cruzi*. Esta observación fue confirmada por los estudios moleculares realizados en este trabajo. La visualización de la banda de 188 pb en el ensayo de PCR (Moser, 1989) indicó que el aislado AM-16 pertenece a la especie *Trypanosoma cruzi*, Cabe destacar que ciertos aislados de *T. cruzi*, incluyendo algunos aislados venezolanos, presentan una baja cantidad de tripomastigotes sanguíneos en los animales experimentales, representando esto un grave problema a fin de obtener cantidad suficiente de ADN del parásito para realizar las PCR

(Messenger y col. 2015). El empleo de parásitos procedentes de la cavidad abdominal de los ratones, mostró ser eficiente para el aislamiento de ADN de *T. cruzi*. Este es el primer reporte del uso de estos flagelados como fuente de ADN para llevar a cabo estudios moleculares (PCR).

El establecimiento y la estandarización del ciclo experimental de *T. cruzi* AM-16 nos permitió el mantenimiento del parásito en el laboratorio para llevar a cabo esta y futuras investigaciones. A pesar de la variación observada entre los ratones de los repiques, se pudo determinar el período ideal para obtener los parásitos que fueron empleados en el resto de los experimentos.

Por otra parte, el estudio parasitológico de la cavidad abdominal de los ratones NMRI infectados con el aislado AM-16., evidenció un claro polimorfismo a lo largo de la fase aguda. Durante la primera semana de infección, el predominio de las formas tripomastigotes observadas, sugirió estar en presencia de formas delgadas de *T. cruzi* durante esta etapa temprana de la fase aguda experimental. Estas observaciones concuerdan con lo descrito por otros autores para los tripomastigotes sanguíneos de forma delgada (Hoare, 1972; Rey, 1991; Rassi y col., 2000). Posteriormente, nuestros resultados mostraron entre los 20 y 27 días post infección, predominancia de formas tripomastigotes cuya descripción coincide con las formas anchas descritas por otros autores para las formas sanguíneas (Hoare, 1972; Rey, 1991; Brener y col., 2000). En este sentido, de acuerdo a Chiari y Brener el grado de dimorfismo en *T. cruzi* puede variar entre las distintas cepas y linajes, predominando en algunos las formas anchas y en otros las formas delgadas (Hoare, 1972). El significado de esas diferencias morfológicas no está perfectamente esclarecido (Rey, 1991). Observaciones realizadas en infecciones experimentales en animales y en

cultivos celulares, sugieren que las formas sanguíneas delgadas de los tripomastigotes desaparecen rápidamente de la circulación, bien sea por haber penetrado en células de distintos tejidos del hospedador, o por ser muy sensibles a las reacciones inmunológicas del mismo (Rey, 1991). Así mismo, describen que las formas anchas sanguíneas no son capaces de penetrar en las células del hospedador vertebrado, persistiendo durante más tiempo en la circulación, mostrándose muy resistentes a la respuesta inmunológica humoral, acumulándose y caracterizando la parasitemia de los períodos crónicos de la infección y siendo muy infectantes para los triatomíneos (Rey, 1991). Estos reportes podrían correlacionarse con los resultados obtenidos en nuestra investigación descritos anteriormente.

Investigaciones realizadas por Lugo y colaboradores (Lugo y col., 2013), empleando las cepas P6 y P11 de *T. cruzi*, demostraron la colonización de la membrana peritoneal, encontrando nidos de amastigotes en ese tejido y alteraciones en la estructura de la misma. Nuestros resultados demostraron el hallazgo de células (presumiblemente macrófagos) en la cavidad abdominal de los ratones, conteniendo gran cantidad de tripomastigotes y amastigotes en su citoplasma, sugiriendo la proliferación de *T. cruzi* AM-16 a los 21 días de infección, hecho que podría estar relacionado con la disminución del peso corporal observada en los animales de los tres grupos experimentales (MB, MG e IP) a los 26 días de infección, posiblemente debido a la invasión de tejidos adyacentes (no evaluado).

Cabe destacar que la variación detectada en la sobrevivencia de los animales de los distintos grupos experimentales, de acuerdo a la vía de infección o puerta de entrada, (MB 75% > MG 50% > IP 42,85%), podría asociarse con las graves manifestaciones clínicas reportadas en seres humanos y la mortalidad (Rojas y col., 2017). En este mismo sentido, la

notable disminución de peso promedio en todos los grupos al inicio de la infección, con énfasis en los ratones infectados en la mucosa bucal, podría indicar el desarrollo del proceso infeccioso en los animales, pese a la ausencia de parasitemia y de tripomastigotes en la cavidad abdominal en algunos ratones. En efecto, a las dos semanas, todos los animales presentaron un aspecto externo característico de la infección chagásica experimental, pelo erizado, disminución de sus movimientos y pérdida de peso. Lo más notable fue la pronta recuperación de los ratones, observando a los 4 a 5 días el aspecto de animales sanos. La vía de administración oral del parásito (mucosa bucal y gástrica) podría haber influido en la marcada disminución de peso inicial, sobre todo en el grupo MB, debido a la penetración de los parásitos a través de las mucosas, invasión y colonización de las células con la consecuente respuesta inflamatoria por parte del sistema inmunológico. En efecto, los estudios histológicos llevados a cabo en esta investigación, revelaron la presencia de focos inflamatorios en diversos tejidos de los ratones infectados por vía oral en la cavidad bucal. La presencia de infiltrados celulares inflamatorios (ICI) en las fibras musculares de la lengua a las 24 y 72 horas post-infección y la alteración de la estructura de estas fibras, fue indicativo de la penetración de los tripomastigotes. Rivera y colaboradores (Rivera y col., 2000) reportan el marcado tropismo de *T. cruzi* hacia el tejido muscular esquelético, concordando con nuestros resultados. Así mismo, fue posible detectar ICI en las regiones pilórica y fúndica del estómago a las 24 y 48 horas p.i., respectivamente. En las mejillas no se detectaron focos inflamatorios ni nidos de amastigotes en los tiempos evaluados. Tampoco se observaron nidos de amastigotes en los otros tejidos procesados. Podemos inferir que debido a los procesos inflamatorios observados en la cavidad bucal y estómago de los animales, la ingesta de alimento, así como la digestión se vio afectada en el grupo inoculado en la mucosa bucal, influyendo en la pérdida de peso observada al inicio.

Lo mismo pudo haber ocurrido en aquellos ratones inoculados por vía oral directamente en el estómago (no evaluado)., Trabajos realizados recientemente por Silva y colaboradores (Silva y col., 2017) con tripomastigotes metacíclicos bioluminiscentes de *T. cruzi* inoculados en la cavidad bucal, mostraron que los parásitos no colonizaron la lengua de los ratones BALB/c, mientras que si se evidenciaron en el estómago a los 21 días post infección (Silva y col., 2017).

El tiempo de infección, tamaño del inóculo, vía de inoculación, estadio y especie a inocular, son variables que deben considerarse y de las cuales dependerá el grado de virulencia de una cepa determinada (Melo y Brener, 1978; Brener, 1985). Nuestros resultados sugieren que la vía de inoculación del aislado AM-16, podría relacionarse directamente con el retraso observado en el día de detección de parasitemia (MB=MG>IP) y con la aparición de los tripomastigotes en la cavidad abdominal (MB>MG> IP). Trabajos realizados con tripomastigotes de la cepa "y" de *T. cruzi*, inoculados por vía intraperitoneal en ratones Balb/c y C57/BL6, indicaron que no parece existir una relación directa entre sobrevivencia y parasitemia, no obstante, sugieren la existencia de una relación directa entre la sobrevivencia y la carga parasitaria en el corazón (Sanoja, 2010). Morocoima en el año 2007, (Morocoima, 2007) trabajó con ratones NMRI infectados con aislados de *T. cruzi* provenientes del Edo. Sucre-Venezuela, sus resultados mostraron que la evolución de la parasitemia no reflejaba el curso de la infección, no estando asociada la cantidad de parásitos en sangre con la patogenicidad observada. Aunque en este trabajo, no se demostró el tropismo cardíaco del parásito, ni se determinó la carga parasitaria cardíaca, reportes anteriores empleando aislados de *T. cruzi* provenientes de chipos *Panstrongylus* sp. silvestres capturados en la zona este del Valle de Caracas, han demostrado el tropismo

cardíaco en ratones NMRI (Díaz, 2014), por lo que planteamos que la mortalidad observada en nuestros experimentos pudiera estar relacionada con la presencia y aumento del número de parásitos en el corazón y el daño tisular que representa. Contrariamente, la posible evasión de la respuesta inmunológica durante la fase aguda inicial, podría haber contribuido a prolongar la vida de algunos de los ratones, desarrollando una infección crónica.

8. BIBLIOGRAFÍA

1. Alarcón de Noya, B., Días-Bello, Z., Colmenares, C., Ruiz-Guevara, R., Noya, O. 2010. La transmisión oral en la enfermedad de Chagas. *Revista de la Facultad de Medicina*, **33** (2): 78-86.
2. Alarcón de Noya, B., Días-Bello, Z., Colmenares, C., Ruiz-Guevara, R., Noya, O. 2010. Enfermedad de Chagas de transmisión oral: vinculación del casi índice con una microepidemia urbana en Venezuela, *Bol Mal Salud Amb.*(1):135-138.
3. Alarcón de Noya, B., Veas, J., Ruiz-Guevara, R., Martín, A., Rojas, C., Machado, I., Telo, C., Henao, L., Días-Bello, Z., Noya, O. 2013. Evaluación clínica y de laboratorio de pacientes hospitalizados durante el primer brote urbano de enfermedad de Chagas de transmisión oral en Venezuela. *Rev Patol Trop.* **42** (2): 177-186.
4. Alarcón de Noya, B., Días-Bello, Z., Colmenares, C., Ruiz-Guevara, R., Mauriello, L., Muñoz-Calderón, A., Noya, O. 2015. Update on oral Chagas disease outbreaks in Venezuela: epidemiological, clinical and diagnostic approaches. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* (110): 3
5. Añez, N., Crisante G., Maia, F., Rojas, A., Carrasco H., Umezawa, E., 2004. Predominance of lineage I among *Trypanosoma cruzi* isolates from Venezuelan patients with different clinical profiles of acute Chagas disease. *Trop Med In Health.* **9**(12): 1319-1326.

6. Añez, N., Crisante G., Khoudeir S., Davila J., Liuzza A, Parada H. 2016. *Trypanosoma cruzi* Persistence in Crevicular Fluid from Inflamed Gum of Chronic Chagasic Patients. *J Dent Oro Surg* **1(5)**: 123.
7. Añez N, Crisante G, Rojas A, Rojas R, Bastidas J. 2016. A new acute oral Chagas disease outbreak in Mérida, Venezuela: A comprehensive study. *Int. J. Clin. Med. Res.***3(1)**: 29-37.
8. Becerril Marco Antonio. 2011. Parasitología médica. Tercera Edición. Editorial McGraw-Hill, México.
9. Brener Z. (1962). Observações sobre a imunidade e as superinfecções em camundongos experimentalmente inoculados com *Trypanosoma cruzi* e submetidos a tratamento. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo.* **4**: 119-123.
10. Brener Z. y Chiari E. 1963. Variacoes morfologicas observadas em diferentes amostras de *Trypanosoma cruzi*. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*, **5**: 220-4.
11. Brener Z, Krettli AU. 1990. Immunology of Chagas disease. In: DJ Wyler, Modern Parasite Biology-Cellular, Immunological, and Molecular Aspects, Freeman Company, New York; 247-261.
12. Brener, Z., Andrade, Z., Barral-Neto, M. 2000. *Trypanosoma cruzi* e Doença de Chagas. Segunda Edición. Editorial Guanabara Koogan S.A. Rio de Janeiro, Brasil.

- 13.** Carrasco, H., Segovia, M., Llewellyn, M., Morocaima, A., Urdaneta-Morales, S. 2012. Geographical Distribution of *Trypanosoma cruzi* Genotypes in Venezuela. *PLoS Negl Trop Dis* **6(6)**:1707-1710.
- 14.** Carrasco, H., Torrellas, A., García, C., Segovia M., Feliciangeli, M.D. 2005. Risk of *Trypanosoma cruzi* I (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) transmission by *Panstrongylus geniculatus* (Hemiptera: Reduviidae) in Caracas (Metropolitan District) and neighboring States, Venezuela. *Bol Mal Salud Amb.* **46(1)**:91-92. URL disponible en: http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1690-46482006000100011&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt. [Consulta: 11 de Agosto de 2016].
- 15.** Carrasco H, Segovia M., Londoño J., Ortegoza, J., Rodríguez M., Martínez, C. 2014 *Panstrongylus geniculatus* and four other species of triatomine bug involved in the *Trypanosoma cruzi* enzootic cycle: high risk factors for Chagas' disease transmission in the Metropolitan District of Caracas, Venezuela. *Parasit Vectors.* **7**:602.
- 16.** Chiari, E. 1999. Chagas Disease Diagnosis Using Polymerase Chain Reaction, Hemoculture and Serologic Methods. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* **94(1)**: 299-300.
- 17.** CDC. 2015. Centers for Disease Control and Prevention. URL disponible en: <http://www.cdc.gov/parasites/chagas/biology.html>. [Consulta: 5 de Agosto de 2016].
- 18.** Contreras. V., 1994. Elementos de apoyo para trabajar en la enfermedad de Chagas. Clementes editores C.A. Universidad de Carabobo. Valencia, Venezuela.

- 19.** Costales, J., Rowland, EC. 2007. A role for protease activity and host-cell permeability during the process of *Trypanosoma cruzi* egress from infected cells. *J Parasitol.* **93(6):**1350-1359
- 20.** Coura, J., Días. J. 2009. Epidemiology, control and surveillance of Chagas disease: 100 years after its discovery. *Mem.Inst. Oswaldo Cruz.* Rio de Janeiro, Brasil. **104(1):** 31-40.
- 21.** Coura, J., Albajar, P. 2010. Chagas disease: a new worldwide challenge. *Nature.* **465.** S6-S7.
- 22.** De Souza, W., 2002. Basic cell biology of *Trypanosoma cruzi*. *Curr. Pharm. Des.* 8, 269–285.
- 23.** Díaz, J. 2006. Notas sobre o *Trypanosoma cruzi* e suas características bioecológicas, como agente de enfermedades transmitidas por alimentos. *Rev Soc Bras Med Trop.* **39:** 370-375.
- 24.** Díaz, M., González C. 2014. Enfermedad de Chagas agudo: transmisión oral de *Trypanosoma cruzi* como una vía de transmisión re-emergente. *Rev. Univ. Ind. Salud.Santander,* **46(2):**177-188.
- 25.** Díaz-Bello Z., Zavala-Jaspe R., Reyes-Lugo M., Colmenares C., Noya-Alarcón O., Noya O., Herrera L., Alarcón de Noya, B. 2016. Urban *Trypanosoma cruzi* Oral Transmission: from a Zoonotic Founder Focus to the Largest Microepidemic of Chagas Disease.*SOJ Microbiol Infect Dis* **4(1):** 1-9.

- 26.** Díaz-Ungría, C., Yépez, S.M, Torres, R., de Viccari, J. 1966. Nuevos estudios sobre transmisión bucal de *Trypanosomas* y demostración de la vía gástrica. .Centro Experimental de Estudios Superiores. Departamento de Parasitología y Zoología médica, Escuela de Ciencias Veterinarias. Barquisimeto-Venezuela.
- 27.** Díaz Centeno, Lurian's. 2014. Evaluación inmunoparasitológica de aislados venezolanos de *Trypanosoma cruzi* provenientes del ciclo peridoméstico de zonas urbanas del Distrito Capital, en el modelo murino de la enfermedad de Chagas. Tesis de Pregrado. Universidad Central de Venezuela, Caracas. Venezuela.
- 28.** Fernández D., González- Baradat, B., Eleizalde M., González-Marcano, E., Perrane, T., Mendoza, M. 2008. *Trypanosoma evansi*: A comparison of PCR and parasitological diagnostic test in experimentally infected mice. *Exp Parasit* 2009. **121**: 1-7.
- 29.** García, N. 2012. Seroprevalencia y Análisis de los factores de riesgo relacionados en la transmisión de la infección por *Trypanosoma cruzi* en la población rural del estado Sucre, Venezuela. Magister Scientiarum. Universidad de Oriente. Cumaná, Venezuela.
- 30.** Gascón, J., Bern, C., Pinazo, M.J. 2010. Chagas disease in Spain, the United States and other non-endemic countries. *Acta Trop*. **115**: 22-27.
- 31.** Gomes, M., Macedo, A., Vago, A. 1998. *Trypanosoma cruzi*: Optimization of polymerase chain reaction for detection in human blood. *Exp Parasitol*.**88**:28-33.

- 32.** Guzmán-Marín, E., Zabala-Castro, J., Acosta-Viana, K., Rosado-Barrera, M. 1999. Importancia de la caracterización de cepas de *Trypanosoma cruzi*. *Rev Biomed.* **10**:177-184.
- 33.** Guzmán-Marín, E., Zavala-Castro, Acosta-Viana, J. Karla, Rosado-Barrera María. 1999. Importancia de la caracterización de cepas de *Trypanosoma cruzi*. *Rev Biomed.* **10**:177-184. URL disponible: <http://www.medigraphic.com/pdfs/revbio/bio-1999/bio993g.pdf> [Consulta: 24 de Julio de 2016].
- 34.** Gürtler R. (2009). Sustainability of vector control strategies in the Gran Chaco Region: current challenges and possible approaches. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* **104(1)**: 52–59.
- 35.** Herrera, L., Martínez, C., Carrasco, H., Jensen A., Urdaneta-Morales, S. 2007. Cornea as a tissue reservoir of *Trypanosoma cruzi*. *Parasitol Res.* **100(6)**: 1395-1399.
- 36.** Hoare, C. 1972. The Trypanosomes of Mammals. Primera Edición. Blackwell Scientific Publications. Oxford and Edinburgh. **II**: 343-346.
- 37.** Hoft, DF., Farrar PL., Kratz-Owens, K., Shaffer, D. 1996. Gastric invasion by *Trypanosoma cruzi* and induction of protective mucosal immune responses. *Infect Immun.* **64**: 3800-3810.
- 38.** Hontebeyrie M; Truyens C. and Frédérique S. 2010. Pathological Consequences of Host Response to Parasite .Montpellier, France. En: American tripanosomiasis disease. One hundred years of research. Editorial Elsevier. **25**: 659-670.

- 39.** Mas E., Poza J., Ciriza J., Zaragoza P., Osta R., Rodellar C. 2015. Fundamento de la Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR). *Rev AquaTIC*. Universidad de Zaragoza, España. URL disponible en: <http://www.revistaaquatic.com/aquatic/html/art1501/basespcr.htm> [Consulta: 16 de Septiembre de 2016].
- 40.** Messenger L., Yeo M., Lewis M., Llewellyn M., Miles M. 2015. Molecular genotyping of *Trypanosoma cruzi* for lineage assignment and population genetics. *Methods Mol Biol.* (1201):297-337.
- 41.** Moser, D., Kirchoff, L., Donelson, J. 1989. Detection of *Trypanosoma cruzi* by DNA Amplication Using the Polymerase Chain Reaction. *J. Clin. Microbiol.* **27 (7)**:1477-1482.
- 42.** Mullis, K. & Faloona F. 1987. Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Meth. Enzymol.* (155):335–350.
- 43.** Lugo de Yarbuh., A., Cáceres, K., Sulbarán, D., Araujo, S., Moreno, E., Carrasco, H., Colasante, C., Mogollón N., Alarcón, M. 2013. Proliferación de *Trypanosoma cruzi* en la membrana peritoneal y líquido ascítico de ratones con infección aguda. *Bol Mal Sal Amb.* **53(2)**: 146-156.
- 44.** Lugones, H. S. 1979. Enfermedad de Chagas en la Infancia. *Rev. Anales de Sanidad.* **13 (1)**, 41-62, Santa Fe, Argentina.

- 45.** OMS, 2010. Enfermedad de Chagas: Control y Eliminación. Reporte por la Secretaría. URL disponible en: http://apps.who.int/gb/ebwha/pdf_files/WHA63/A63_17-en.pdf [Consulta: 20 de Julio de 2016].
- 46.** OMS, 2017. La enfermedad de Chagas (tripanosomiasis americana). Nota descriptiva N°340 Marzo de 2017. URL disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/es/> [Consulta: 28 de Marzo de 2017].
- 47.** Patterson JS, Guhl F. 2010. Geographical Distribution of Chagas Disease American Trypanosomiasis. *Elsevier*, London, pp. 83-114.
- 48.** Pinto-Dias, J., Silveira, AC, Schofield, CJ. The Impact of Chagas Disease Control in Latin America. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* **97(5)**: 603-612
- 49.** Rassi A. y Luquetti A.O. Therapy of Chagas disease. 1992: En: Wendel S., Brener Z., Camargo M.E y Rassi, A. Chagas disease (American Trypanosomiasis): its impacts on transfusión and clinical medicine. ISBT Saõ Paulo, Brazil. 237-247.
- 50.** Rassi, A. Rassi A. J., Gabriel., 2000. Fase aguda En: Brener, Z., Andrade, Z., Barral-Neto, M. 2000. *Trypanosoma cruzi* e Doença de Chagas. Segunda edición. Editorial Guanabara koogan S.A. Rio de Janeiro, Brasil.
- 51.** Rassi.A. Jr, Rassi, A. Marin-Neto, JA. 2010 Chagas disease. *Lancet* 2010. **375(9723)**:1388-402.

- 52.** Rey, L. 1991. Parásitos e Doenças Parasitarias do Homen nas Americas e na Africa. Segunda Edición. Editorial. Guanabara Koogan S.A. Rio de Janeiro, Brasil. **(11):** 2-3.
- 53.** Ribeiro, A., Costa, M. 2000. Forma indeterminada da Doença de Chagas. En: Brener, Z., Andrade, Z., Barral-Neto, M. 2000. *Trypanosoma cruzi* e Doença de Chagas. Segunda Edición. Editorial Guanabara koogan S.A. Rio de Janeiro, Brasil.
- 54.** Robertson, L., Devleeschauwer, B., Alarcón de Noya, B., Noya, O., Togerson P. 2016 *Trypanosoma cruzi*: Time for International Recognition as a Foodborne Parasite. *PLoS Negl Trop Dis.* **10(6):** e0004656.
- 55.** Robertson L., van der Giessen J., Batz M., Kojima M, Cahill S. 2013. Have foodborne parasites finally become a global concern? *Trends Parasitol*, **29**:101-3.
- 56.** Rojas, C., Machado, I., Alarcón de Noya, B. 2017. Chagas Disease by Oral Transmission: Cardiovascular Manifestations. *J Cardiol Curr Res*, **8(1):** 00270.
- 57.** Rivera, I., Moreno, E., González, N., Lugo de Yarbuh, A. 2000. Caracterización de aislados de *Trypanosoma cruzi* del Occidente de Venezuela. *Rev. Ecol. Lat. Am.* **7(3):** 1-10.
- 58.** Ross & Pawlina. 2007. Histología. Texto y Atlas color con Biología Celular y Molecular. Quinta Edición. Editorial médica: Panamericana.
- 59.** Repetto, E., Zachariah, R., Kumar, A., Angheben, A., Gobbi, F., Anselmi, M., Al Rousan, A., Torrico, C. Ruiz, R., Ledezma, G., Bouninsegna M., Khogali, M., Van den Bergh, R., De Maio, G., Egidi, A., Maccagno, B., Garelli, S. 2015. Neglect of a Neglect

Disease in Italy: The Challenge of Access-to-Care for Chagas disease in Bergamo Area. *PLOS Neglect Tropical Diseases*. DOI: 10.1371/journal.pntd.0004103.

60. Rueda, K. Trujillo, J., Carranza, J., Vallejo G. 2014. Transmisión oral del *Trypanosoma cruzi*: una nueva situación epidemiológica de la enfermedad de Chagas en Colombia y otros países suramericanos. *Biomédica* **34**:631-41.

61. Rozendaal, J. 1997. Vector control. Methods for use by individuals and communities. World Health Organization. Geneva. **3**.p-213.

62. Sanoja, C. 2001. Parámetros en la quimioterapia experimental de la enfermedad de Chagas: evaluación comparativa de inhibidores de la síntesis de ergosterol en el modelo murino. Trabajo para optar por la categoría de Profesor Asistente. Universidad Central de Venezuela. Caracas, Venezuela.

63. Sanoja, C. 2010. Respuesta inmunoreguladora y su relación con inmunopatología cardíaca en la infección por *Trypanosoma cruzi*. Tesis Doctoral. Universidad Autónoma de Madrid. Madrid, España.

64. Schijman, A. 2008. Guía del Taller y Simposio “Estandarización y validación del uso clínico de la reacción en cadena de la polimerasa para detección de infección por *Trypanosoma cruzi*”.

- 65.** Segovia M, Carrasco H, Martínez CE, Messenger L, Nessi A, Londoño J, Espinosa R, Martínez C, Alfredo M, Bonfante-Cabarcas R, Lewis M, de Noya B, Miles M, Llewellyn M. 2013. Molecular epidemiologic source tracking of orally transmitted Chagas disease, Venezuela. *Emerg Infect Dis.* **19(7)**:1098-101.
- 66.** Silva-dos-Santos, D., Barreto-de-Albuquerque,J.,Guerra, B., Moreira, O., Berbert,L. Tavares Ramos,M.,S. Mascarenhas,B., Britto, C., Morrot, A., Serra Villa-Verde, D.,Ribeiro Garzoni,L.,Savino,W.,Cotta-de-Almeida,S.,de Meis, J.2017. Unraveling Chagas disease transmission through the oral route: Gateways to *Trypanosoma cruzi* infection and target tissues. *PLoS Negl Trop Dis* **11(4)**: e0005507
- 67.** Tosso, A., Vial, F. y Galanti N. 2011. Transmisión de la enfermedad de Chagas por vía oral. *Rev Med Chile* 2011. **139**: 258-266.
- 68.** Weiss, B., Aksoy, A. 2011. Microbiome influences on insect host vector competence. *Elsevier.* **27(11)**: 514–522.
- 69.** WHO, 2015. Weekly epidemiological record. Chagas disease. **6 (90)**:33–44. URL disponible en: <http://www.who.int/wer/2015/wer9006.pdf> [Consulta: 20 de Abril de 2017].
- 70.** Yoshida, N. 2009. Molecular mechanisms of *Trypanosoma cruzi* infection by oral route. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro. **104(1)**:101-107.

71. Zingales, B., Andrade, SG., Briones, MR., Campbell, DA., Chiari. E., Fernandez, O., Guhl,F., Lager-Silva, E., Macedo, AM., Machado, MR., Miles, MA., Romanha, AJ., Sturn, NR., Tibayrenc, H., Schijman, AG. (2009). A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcIV. *Memb Inst Oswaldo Cruz.* **104**:1051-1054.

7. CONCLUSIONES

- La estandarización de los periodos patente y subpatente del aislado venezolano *T. cruzi* AM-16 en sangre y cavidad abdominal de ratones NMRI, permitió el establecimiento del ciclo experimental del parásito en el modelo ratón-*Rhodnius prolixus*.
- Los métodos parasitológicos y moleculares aplicados sitúan al aislado AM-16 en el taxón especie *Trypanosoma cruzi*.
- La elevada concentración de tripomastigotes en la cavidad abdominal y su permanencia durante la fase aguda, representa una fuente alternativa para la obtención de ADN de *T. cruzi*, compensando la baja parasitemia que se detecta en la mayoría de los aislados venezolanos y la dificultad que constituye la obtención de suficiente ADN a partir de tripomastigotes sanguíneos para la realización de ensayos moleculares (PCR).
- El porcentaje de sobrevivencia de los ratones NMRI varía de acuerdo a la vía de inoculación del aislado AM-16: intraperitoneal>mucosa gástrica> mucosa bucal.
- El pleomorfismo de los tripomastigotes encontrados en la cavidad abdominal de ratones NMRI, sugiere que podrían existir formas anchas y delgadas comparables con las formas sanguíneas descritas por otros autores. Se sugiere un estudio detallado de la cavidad abdominal, la cual parece estar como un reservorio de los parásitos para evadir la respuesta inmunológica del hospedador.
- La presencia de focos inflamatorios (ICI) durante los primeros días post infección, en el músculo esquelético de la lengua y en las regiones fúndica y pilórica del estómago de ratones

inoculados por vía oral-mucosa bucal, propone a estos órganos como blanco para la entrada del parásito hacia el resto de los tejidos.