

**EVALUACIÓN DE LA INFECCIÓN EXPERIMENTAL CON *Trypanosoma cruzi* I  
POR VÍA ORAL EN RATAS Wistar (*Rattus norvegicus*)**

**JAVIER EDUARDO NIETO PICO**

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER  
FACULTAD DE SALUD  
ESCUELA DE MICROBIOLOGÍA  
MAESTRÍA EN CIENCIAS BÁSICAS BIOMÉDICAS  
BUCARAMANGA**

**2019**

**EVALUACIÓN DE LA INFECCIÓN EXPERIMENTAL CON Trypanosoma cruzi I  
POR VÍA ORAL EN RATAS Wistar**

**JAVIER EDUARDO NIETO PICO**

**Trabajo de grado presentado para optar al título de  
Magíster en Ciencias Básicas Biomédicas**

**Directora**

**CLARA ISABEL GONZÁLEZ RUGELES  
MSc en Microbiología, PhD Ciencias Biológicas**

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER  
FACULTAD DE SALUD  
ESCUELA DE MICROBIOLOGÍA  
MAESTRÍA EN CIENCIAS BÁSICAS BIOMÉDICAS  
BUCARAMANGA**

**2019**

## AGRADECIMIENTOS

*A Dios por la fortaleza, por la vida y cada oportunidad y bendición que me ha dado.*

*A la Dra. Clara Isabel González Rugeles y al Grupo de Inmunología y Epidemiología Molecular por haberme abierto las puertas y enseñarme tantas cosas.*

*A mi familia por ser siempre el respaldo incondicional en este largo y arduo camino.*

*A mis compañeros de maestría y laboratorio, Freddy, Erika, Karol, Jenny, Martha, Jesús y Claudia, por cada consejo, invaluable apoyo y acompañamiento permanente para no desfallecer.*

*A mis hijos Sara Lucía y Santiago y a su madre por haber soportado mi ausencia y darme su apoyo durante gran parte de este recorrido.*

*A mis grandes maestros, Víctor Hernán, Carlos Conde, María Carolina y Ernesto, por su tiempo, enseñanzas, palabras de aliento y acompañamiento para pensar en voz alta y ayudarme siempre a seguir y mejorar.*

*A mi Novia Danna Katarina quien me acompañó incondicionalmente al final del camino por incontables horas, motivándome, alentándome y siendo mi soporte para alcanzar la meta propuesta.*

*A ellos y a todos los demás a quienes en el camino encontré, gracias.*

## TABLA DE CONTENIDO

	<b>Pág.</b>
INTRODUCCIÓN .....	14
1. ENFERMEDAD DE CHAGAS.....	17
1.1 RECUENTO HISTÓRICO .....	17
1.2 EPIDEMIOLOGÍA .....	19
1.3 AGENTE ETIOLÓGICO: Trypanosoma Cruzi.....	21
1.4 CICLO DE VIDA.....	23
1.5 VÍAS DE TRANSMISIÓN.....	24
1.5.1 Transmisión vectorial .....	24
1.5.2 Transmisión por vía transfusional y trasplante de órganos.....	25
1.5.3 Transmisión vertical .....	26
1.5.4 Transmisión oral .....	26
1.6 MANIFESTACIONES CLÍNICAS .....	28
1.6.1 Fase aguda .....	29
1.6.2 Fase crónica indeterminada.....	29
1.6.3 Fase crónica sintomática .....	29
1.7 DIAGNÓSTICO.....	30
1.8 TRATAMIENTO .....	31
1.9 MODELOS ANIMALES (RATA) PARA EL ESTUDIO DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS.....	32
2. JUSTIFICACIÓN.....	34
3. OBJETIVOS.....	35
3.1 OBJETIVO GENERAL .....	35
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	35
4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	36
4.1 POBLACIÓN DE ESTUDIO .....	36
4.1.1 Cepa del parásito.....	36
4.1.2 Animales .....	36

4.1.3 Inóculo .....	36
4.2 OBTENCIÓN DE LAS MUESTRAS .....	37
4.2.1 Parasitemia .....	37
4.2.2 Tejidos .....	37
4.3 VARIABLES ANALIZADAS.....	38
4.3.1 Parasitemia .....	38
4.3.2 Mortalidad .....	38
4.3.3 Análisis histopatológico.....	38
4.3.4 Otras variables.....	40
4.4 GRUPOS EXPERIMENTALES .....	40
4.4.1 Elección del inóculo .....	40
4.4.2 Evaluación de la infección experimental por T. cruzi por vía oral .....	40
4.4.3 Evaluación de la infección experimental por T. cruzi por vía oral (repetición).....	40
4.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....	41
4.6 ASPECTOS ÉTICOS .....	41
5. RESULTADOS.....	43
5.1 ELECCIÓN DEL INÓCULO .....	43
5.1.1 Evolución de la parasitemia .....	43
5.1.2 Peso.....	45
5.1.3 Consumo de alimento .....	46
5.2 EVALUACIÓN DE LA INFECCIÓN EXPERIMENTAL CON T. Cruzi Por Vía Oral .....	47
5.2.1 Evolución de la parasitemia .....	47
5.2.2 Peso.....	49
5.2.3 Análisis histopatológico.....	50
6. DISCUSIÓN.....	61
7. CONCLUSIONES .....	70
8. RECOMENDACIONES.....	71
BIBLIOGRAFÍA.....	72

## LISTA DE FIGURAS

Pág.

Figura 1. Número estimado de inmigrantes con infección por T. cruzi viviendo en países no endémicos. Tomado de Rassi et al., 2010. ....	20
Figura 2. Estadios del ciclo biológico de Trypanosoma cruzi. A) Epimastigote, B) Tripomastigote, C) Amastigote. Tomado de (Santana, 2015). ....	21
Figura 3. Ciclo de vida de T. cruzi. Tomado de Bern, 2015 (Bern, 2015).....	23
Figura 4. Evolución de la parasitemia - experimento elección del inóculo .....	44
Figura 5. Evolución del peso - experimento elección del inóculo .....	46
Figura 6. Consumo de alimento - experimento elección del inóculo .....	47
Figura 7. Evolución de la parasitemia .....	48
Figura 8. Evolución del peso.....	50
Figura 9. Presencia de infiltrado inflamatorio asociado a la evolución de la infección en animales infectados por vía intraperitoneal.....	53
Figura 10. Presencia de infiltrado inflamatorio asociado a la evolución de la infección en animales infectados por oral .....	54
Figura 11. Distribución del infiltrado inflamatorio asociado a la evolución de la infección en animales infectados por vía intraperitoneal .....	55
Figura 12. distribución del infiltrado inflamatorio asociado a la evolución de la infección en animales infectados por oral .....	56
Figura 13. Presencia de nidos de amastigotes por vía de infección asociado a la evolución de la infección (IP) .....	57
Figura 14. Presencia de nidos de amastigotes por vía de infección asociado a la evolución de la infección (VO) .....	57
Figura 15. Distribución de la presencia de nidos de amastigotes asociado a la vía de infección y a la evolución de la parasitemia. ....	58
Figura 16. Cantidad de nidos de amastigotes independiente de la vía de infección y evolución de la parasitemia.....	59
Figura 17. Nidos de amastigotes por tejido (independiente de la vía de infección) .....	60

## LISTA DE TABLAS

	<b>Pág.</b>
Tabla 1. Cantidad de tejidos analizados (%).....	51
Tabla 2. Distribución de los tejidos analizados (%) por vía de infección y evolución de la infección.....	52
Tabla 3. Presencia de infiltrado inflamatorio asociado a la vía de infección .....	52

## LISTA DE IMÁGENES

	<b>Pág.</b>
Imagen 1. Presencia de infiltrado inflamatorio. ....	54
Imagen 2. Presencia de nidos de amastigotes en los tejidos. ....	58

## RESUMEN

**TÍTULO:** EVALUACIÓN DE LA INFECCIÓN EXPERIMENTAL CON *Trypanosoma cruzi* I POR VÍA ORAL EN RATAS Wistar (*Rattus norvegicus*) \*

**AUTOR:** NIETO PICO Javier Eduardo \*\*

**PALABRAS CLAVES:** Cardiomiopatía chagásica crónica, cardiomiopatía dilatada.

### DESCRIPCIÓN

La enfermedad de Chagas es una enfermedad de transmisión vectorial causada por el protozoo intracelular *Trypanosoma cruzi*, representa un grave problema de salud pública a nivel mundial, se estima afecta alrededor de 8 millones de personas especialmente en América Latina. Su transmisión está ligada al contacto con heces de triatomíneos infectados, sin embargo, recientemente ha llamado la atención la presentación de brotes de la enfermedad causados por transmisión oral. La fisiopatología de la infección por esta vía, considerada reemergente, no está totalmente esclarecida, por lo cual los modelos animales son de vital importancia para entender los mecanismos diferenciales de la fisiopatología entre las diferentes vías de infección. El objetivo de este trabajo fue evaluar la evolución de la infección experimental por *T. cruzi* por vía oral en ratas Wistar. Se realizó la evaluación de la infección experimental con *Trypanosoma cruzi* DTU I por vía oral en ratas Wistar, estableciendo inicialmente el inóculo capaz de reproducir la fase aguda de la enfermedad y posteriormente evaluando la evolución de la parasitemia y los hallazgos histopatológicos. En la evaluación del inóculo se estableció que el inóculo de 1 200 000 tripomastigotes por vía oral fue capaz de provocar la mayor parasitemia patente en las ratas. Se pudo observar la presencia de nidos de amastigotes en corazón (ventrículo y aurícula) y músculo esquelético. El estudio demuestra que es posible establecer un modelo animal para reproducir la fase aguda de la Enfermedad de Chagas (ECh) mediante la infección experimental con *T. cruzi* I por vía oral en ratas Wistar (*Rattus norvegicus*).

---

\* Trabajo de grado.

\*\* Facultad de Salud. Maestría en Ciencias Básicas Biomédicas. Directora de trabajo de grado: Clara Isabel González Rugeles. MSc en Microbiología, PhD Ciencias Biológicas.

## SUMMARY

**TITLE:** EVALUATION OF EXPERIMENTAL INFECTION BY ORAL ROUTE WITH *Trypanosoma cruzi* I IN RATS Wistar (*Rattus norvegicus*)\*

**AUTHORS:** NIETO PICO Javier Eduardo\*\*

**KEY WORDS:** Chronic chagasic cardiomyopathy, dilated cardiomyopathy.

### DESCRIPTION

Chagas disease is a vector-borne disease caused by the intracellular protozoan *Trypanosoma cruzi*, represents a serious public health problem worldwide. It is estimated that it affects around 8 million people, especially in Latin America. The transmission is linked to the contact with feces of infected triatomines, however, recently the presentation of outbreaks of the disease caused by oral transmission has been drawn attention. The pathophysiology of the infection for this route, is considered reemerging, and it is not yet fully understood, for which the animal models are of vital importance to understand the differential mechanisms of the pathophysiology between the different infection routes. The aim of this study was evaluate the evolution of infection by *T. cruzi* in Wistar rats experimentally infected by oral route. The experimental infection with *Trypanosoma cruzi* DTU I was evaluated orally in Wistar rats, initially was establishing the inoculum capable of reproducing the acute phase of the disease and subsequently was evaluate the evolution of parasitaemia and histopathological findings. In the inoculum evaluation was established that the inoculum of 1 200 000 trypomastigotes orally was able to cause the highest patent parasitemia in the rats. Was possible observe the presence of amastigote nests in the heart (ventricle and auricle) and skeletal muscle, The study demonstrates that is possible establish an animal model to reproduce the acute phase of Chagas Disease (CHD) with *T. cruzi* I in Wistar rats experimentally infected by oral route (*Rattus norvegicus*).

---

\* MSc. Thesis.

\*\* School of Health. Master's Degree in Basic Biomedical Sciences. Director of graduate work: Clara Isabel González Rugeles. MSc in Microbiology, PhD Biological Sciences.

## INTRODUCCIÓN

La enfermedad de Chagas es una enfermedad tropical desatendida de carácter zoonótico que representa un gran problema de salud pública porque afecta aproximadamente entre 6 y 7 millones de personas en América Latina (WHO, 2009, 2015). Esta enfermedad es causada por el protozoo intracelular *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*), que se transmite principalmente por el contacto con heces de triatomíneos infectados, así como por vía congénita, oral, transfusional y por accidente laboral.

La transmisión oral de la enfermedad es considerada ocasional y rara, a pesar de ello, ha sido descrita en países como Brasil, Venezuela (de Suárez & Niño, 2010; Noya et al., 2015) y recientemente ha llamado la atención en Colombia (Rueda, Trujillo, Carranza, & Vallejo, 2014), donde se han reportado microbrotes de enfermedad de Chagas agudo asociados al consumo de bebidas o alimentos contaminados con *T. cruzi* (Coura & Junqueira, 2012; Ramírez et al., 2013). En Colombia, desde el año 2008 se han reportado microbrotes en diferentes departamentos (Díaz et al., 2015; Hernández, Ramírez Cano, Cucunubá, & Zambrano, 2008; Ríos, Arboleda, Montoya, Alarcón, & Parra Henao, 2011; Triana & Suárez, 2014), involucrando casos fatales, asociados estos a la infección oral y a la fase aguda de la enfermedad (Dias et al., 2008; Díaz & González, 2014; Rueda et al., 2014). La transmisión oral de la enfermedad es considerada como una vía reemergente, con morbilidad y mortalidad mayor cuando se compara con las otras vías de infección. Su presentación ha sido reportada en áreas, tanto urbanas como rurales, en las cuales no se encuentran vectores domiciliados pero sí en el peridomicilio, así como la presencia de pequeños mamíferos del género *Didelphis* (Díaz & González, 2014).

Dada la importancia de la enfermedad de Chagas como un problema de salud pública en América Latina, son innumerables los estudios que han sido desarrollados en modelos animales. Estos modelos han sido importantes para

entender los mecanismos involucrados en el proceso patológico de las diferentes fases y formas clínicas de la enfermedad que se observan en los seres humanos (Desquesnes & de Lana, 2010), así como la descripción del comportamiento biológico de *T. cruzi* (Andrade, Machado, Chiari, Pena, & Macedo, 1999; Monteón et al., 2009; Rodriguez et al., 2014), el tropismo tisular (Andrade et al., 1999; Rodriguez et al., 2014), la genética del parásito (Camandaroba et al., 2002, enfoques terapéuticos (Cevey, Mirkin, Penas, & Goren, 2016; Manarin et al., 2013), entre otros. Los ratones y las ratas son los modelos animales más frecuentemente utilizados para el estudio de la enfermedad de Chagas. Las ratas, al parecer son más resistentes a la infección por *T. cruzi* que el ratón, sin embargo, varios autores han podido reproducir la enfermedad utilizando cepas de alta virulencia e inóculos grandes de parásito, logrando evaluar el curso de la enfermedad tanto en su fase aguda como crónica (Desquesnes & de Lana, 2010).

A pesar de que la vía oral es la forma más común de transmisión del parásito entre los animales en la naturaleza, la mayoría de estudios experimentales son desarrollados con animales inoculados por vía intraperitoneal, existiendo pocos estudios sobre el desarrollo de la infección experimental con *T. cruzi* por vía oral (Camandaroba et al., 2002), dando lugar a que varias de las características fisiopatológicas de la fase aguda de la enfermedad por transmisión oral estén aun por vislumbrarse. Por otra parte, dado que en Colombia y especialmente en Santander se han presentado recientemente brotes de la enfermedad en su forma aguda con probable transmisión oral y que estos casos han mostrado morbilidad y mortalidad elevada y el manejo clínico y terapéutico de estos pacientes es sintomático en conjunto con tratamiento antiparasitario específico, en este proyecto se plantea el establecimiento de un modelo murino (rata) con infección oral que permita describir el desarrollo de la enfermedad especialmente en su fase aguda para poderlo emplear en estudios relacionados con el manejo clínico, cardiológico y terapéutico de posible aplicación en pacientes humanos. En la evaluación del inóculo se estableció que el inóculo de 1 200 000 tripomastigotes por vía oral fue

capaz de provocar la mayor parasitemia patente en las ratas. Se pudo observar la presencia de nidos de amastigotes en corazón (ventrículo), músculo esquelético, colon y esófago. El estudio demuestra que es posible establecer un modelo animal para reproducir la fase aguda de la Enfermedad de Chagas (ECh) mediante la infección experimental con *T. cruzi* I por vía oral en ratas Wistar (*Rattus norvegicus*).

## 1. ENFERMEDAD DE CHAGAS

La ECh, descrita por primera vez en el año 1909 por el médico infectólogo Carlos Chagas, es una enfermedad tropical desatendida de carácter zoonótico causada por el parásito protozoario *T. cruzi* que representa un problema de salud pública en América Latina. La distribución geográfica de la enfermedad, de los vectores y los reservorios se extiende desde el sur de los Estados Unidos hasta Argentina y Chile, se estima que la enfermedad afecta alrededor de ocho a nueve millones de personas en 21 países y además noventa millones se encuentran en riesgo de contraer la infección (WHO, 2015). La prevalencia de la ECh para Colombia se estima entre 700 000 y 1 200 000 personas infectadas, existiendo alrededor de ocho millones de individuos más en riesgo de adquirir la infección (Díaz & González, 2014).

### 1.1 RECUENTO HISTÓRICO

La ECh o Tripanosomiasis americana es una enfermedad tropical transmisible que se encuentra entre las más prevalentes en América Latina (Pan American Health Organization & World Health Organization, 2016). Datos proporcionados por la paleoparasitología sugieren que la ECh había alcanzado la población humana en la región andina hace más de 9000 años. La presencia más antigua de *T. cruzi* que ha podido ser detectada en seres humanos se remonta a los nómadas del pueblo Chinchorro, que fundaron los primeros asentamientos en la región litoral del desierto de Atacama, Chile. Posteriormente, infecciones con *T. cruzi* fueron también relacionadas con pueblos nómadas subsiguientes a los Chinchorros que vivían en la misma área hasta la época de la conquista española en el siglo XVI. De igual forma se ha detectado ADN de *T. cruzi* en nómadas del valle de Peruaçu (Mato Grosso, Brasil) y en el desierto de Chihuahua (Texas, EUA) (Santana, 2015; Steverding, 2014).

El primer reporte de ECh fue realizado por Carlos Ribeiro Justiniano da Chagas en el año 1909 en la ciudad de Lassance (MG, Brasil), mientras este adelantaba y coordinaba actividades asociadas al control de la malaria (Moncayo, 2010). Se describe que Carlos Chagas recolectó y examinó diversas especies de fauna brasilera, entre ello identificó una nueva especie de *Trypanosoma*, la cual bautizó como *T. minasense*. Los habitantes locales describían un insecto, el cual se conocía popularmente con el nombre de “barbero” (esto por el hecho de que picaba a sus víctimas especialmente en el rostro mientras estos dormían). Estos insectos se encontraban frecuentemente en viviendas de condiciones precarias, típicas en esta región. Carlos Chagas, quien reconocía la importancia de los insectos hematófagos como transmisores de enfermedades, examinó algunos de estos insectos, encontrando en su intestino, tripanosomatídeos. Posterior a esto logró determinar que se trataba de una nueva especie de protozooario, nombrándolo *Trypanosoma cruzi* como homenaje a su mentor y amigo el Dr. Oswaldo Gonçalves Cruz (Santana, 2015; Steverding, 2014).

A partir del descubrimiento inicial, Carlos Chagas identificó el protozooario en un gato, identificando a este como un reservorio doméstico. Buscando determinar si el parásito representaba un riesgo patológico para los seres humanos, realizó exámenes de sangre a los ciudadanos de Lassance, allí identificó el *T. cruzi* en un extendido de sangre periférica de una niña de 2 años que cursaba con picos febriles (Chagas, 1909). Carlos Chagas identificó el agente etiológico y su ciclo evolutivo en los hospederos invertebrados y vertebrados, así mismo, la sintomatología inherente a la fase aguda de la enfermedad y desarrolló la primera prueba diagnóstica (gota gruesa) (Carrada-Bravo, 2004b; Steverding, 2014). Finalmente estudió y describió la patología, la epidemiología, mecanismos de transmisión y forma de tratamiento de la misma. Además de eso, logró que las autoridades sanitarias reconocieran y dieran importancia a la enfermedad, sobre todo por el hecho de que la nueva enfermedad tropical tenía un carácter nacional desde varios puntos de vista, además del geográfico (Kropf, 2009; Moncayo, 2010).

La ECh se encuentra asociada a diversos factores sociodemográficos y ambientales que ponen en riesgo a millones de personas a la infección. Hasta mediados de la década de 1970, el riesgo de la transmisión de *T. cruzi* se encontraba relacionado directamente con la pobreza y las malas condiciones de las viviendas en áreas endémicas. Sin embargo, a partir del éxodo rural y a intrusión del hombre en los ecosistemas donde naturalmente habita el vector llevó a un cambio en los patrones normales de la epidemiología de la enfermedad, llevándola a ser una infección también urbana (Moncayo, 2010; Pan American Health Organization & World Health Organization, 2016; WHO, 2009).

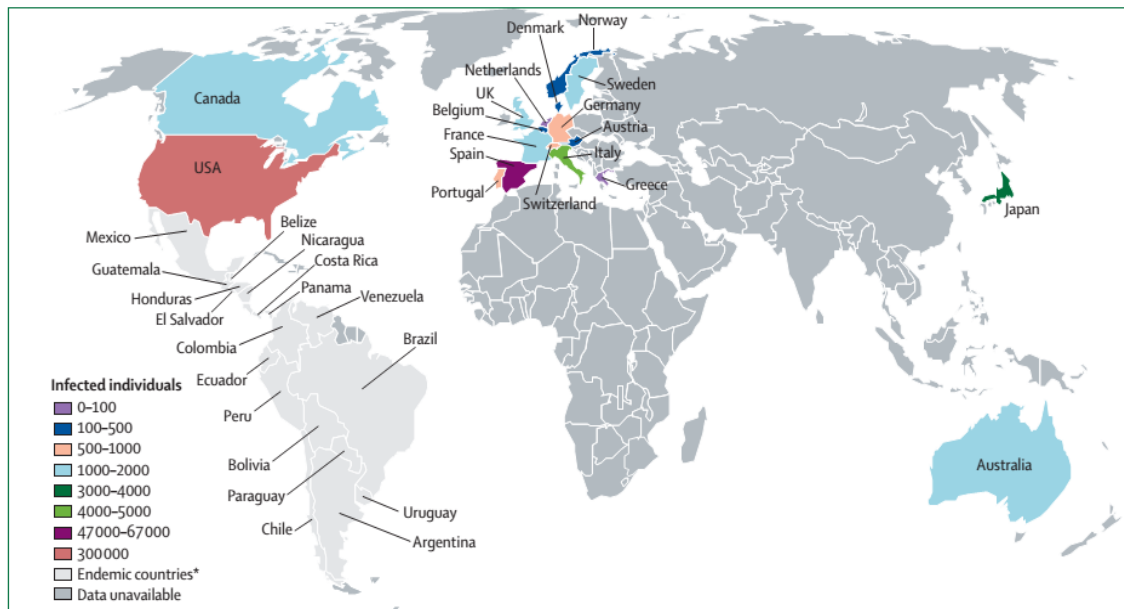
## **1.2 EPIDEMIOLOGÍA**

Para la Organización Mundial de la Salud (OMS), la ECh se encuentra incluida dentro de un grupo de 17 enfermedades tropicales desatendidas, las cuales se relacionan con pacientes infectados que viven en condiciones socioeconómicas desfavorables principalmente en países en vías de desarrollo (Organización Mundial de la Salud, 2018; Pan American Health Organization & World Health Organization, 2016). A partir de lo anterior, se reconoce a la ECh como uno de los problemas más significantes del continente americano en términos de salud pública e impacto socioeconómico. Datos proporcionados por la OMS en el año 2007, estiman la existencia de 8 a 9 millones de individuos infectados por *T. cruzi* en América Latina, esto permite inferir que a pesar de que la enfermedad fue descubierta hace 103 años, continúa desatendida y se considera la principal causa de muerte entre las enfermedades parasitarias, incluyendo la malaria (Guhl & Lazdins-Helds, 2007; Schmunis, 2007; Westphalen, Bisugo, & Araújo, 2012). La ECh es considerada como una zoonosis dependiente del desplazamiento de los vectores desde sus hábitats silvestres hasta áreas periurbanas (Westphalen et al., 2012).

La transmisión y morbilidad de la ECh estaban relacionadas históricamente con el continente americano, a pesar de ello, la detección de pacientes seropositivos en

países no endémicos como Estados Unidos, Canadá, España, Francia, Suiza, Italia y Australia se ha incrementado, especialmente como consecuencia de la migración humana en las últimas décadas, esto convierte a la ECh en un tema de salud pública de interés mundial (Pérez-Molina & Molina, 2018) (Figura 1).

Figura 1. Número estimado de inmigrantes con infección por *T. cruzi* viviendo en países no endémicos. Tomado de Rassi et al., 2010.



Fuente: Rassi et al., 2010.

En Bolivia se ha reportado la más alta prevalencia de la ECh (6,8%) seguida de Argentina (4,1%), El Salvador (3,4%), Honduras (3,1%) y Paraguay (2,5%) (Rassi, Rassi, & Marin-Neto, 2010).

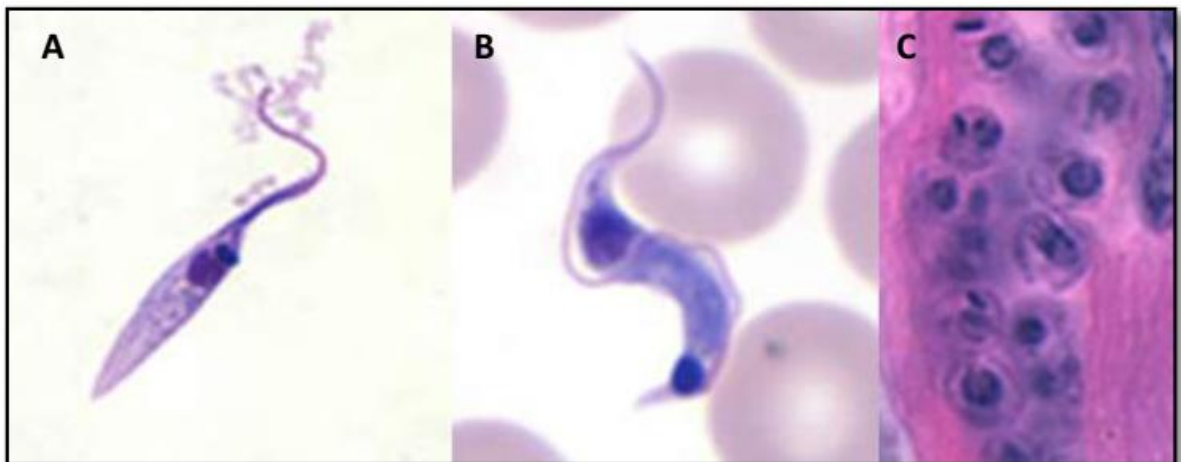
En Colombia de acuerdo al Sistema de Vigilancia en Salud Pública (SIVIGILA) en el año 2017 se notificaron 746 casos de ECh, de los cuales 31 fueron diagnosticado en fase aguda y 715 en fase crónica. En el municipio de Yopal fueron notificados la mayoría de los casos (139) seguido de Nuchia (45), la mayor parte de los casos

fueron reportados en los departamentos de Casanare, Boyacá y Santander en donde se notificaron el 73,3 % de los casos (crónicos) (León Nuñez, 2017).

### 1.3 AGENTE ETIOLÓGICO: *Trypanosoma Cruzi*

*Trypanosoma cruzi* es un protozooario hemoflagelado intracelular obligado que pertenece al orden *Kinetoplastida*, familia *Trypanosomatidae*. Se caracteriza por la presencia de un flagelo y una mitocondria única en la cual se ubica una organela que contiene ADN especializado que se denomina cinetoplasto (Brener, 1973; Chagas, 1909; Vianna Martins et al., 2012). *T. cruzi* es un organismo altamente diversificado y especializado, que presenta varias particularidades que lo hacen interesante desde el punto de vista filogenético y evolutivo (León, Hernández, Montilla, & Ramírez, 2015; Vianna Martins et al., 2012). El parásito presenta tres formas o estadios en su ciclo biológico (figura 2), los cuales son identificables morfológicamente por la posición del cinetoplasto con relación al núcleo de la célula y la presencia o ausencia de membrana ondulante (flagelo).

Figura 2. Estadios del ciclo biológico de *Trypanosoma cruzi*. A) Epimastigote, B) Tripomastigote, C) Amastigote.



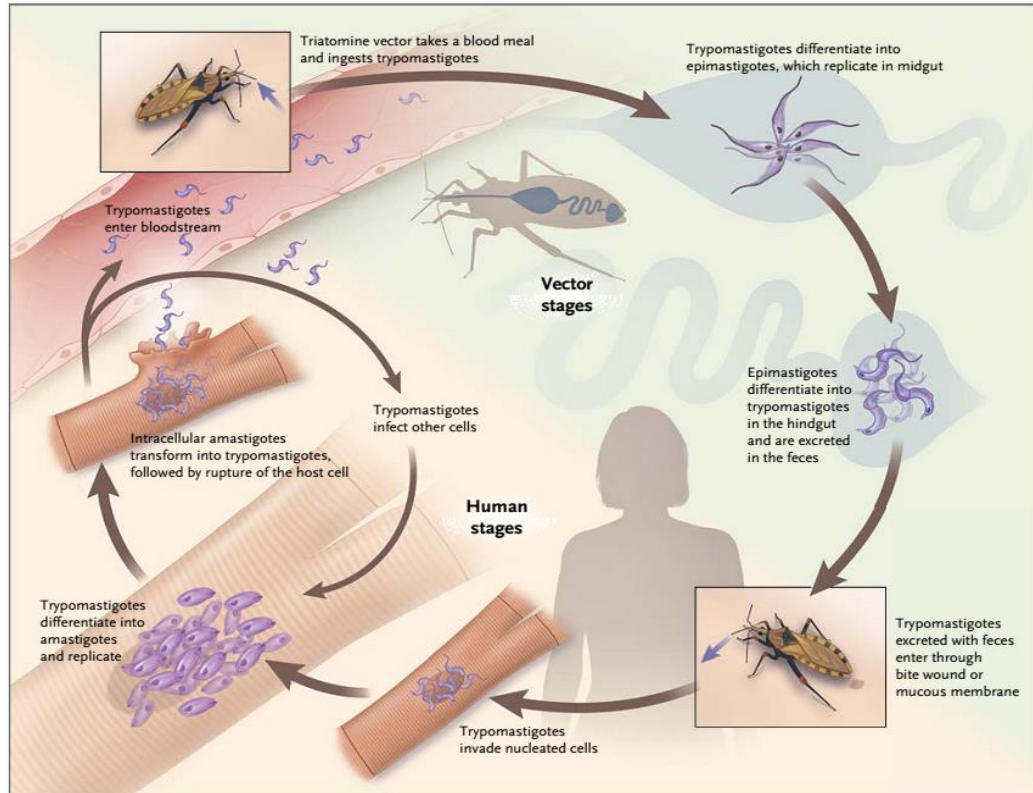
Fuente: Santana, 2015.

La forma de tripomastigote (figura 2) se encuentra en la porción distal de intestino del insecto vector (Tripomastigote metacíclico), igualmente en la sangre y en el espacio intracelular del hospedero vertebrado. Presenta como característica su forma alargada y levemente aplastada, con el cinetoplasto bien apartado y posterior al núcleo, este último se encuentra bien centralizado y de forma ovalada. El flagelo emerge de la bolsa flagelar y recorre toda la extensión lateral del cuerpo del parásito formando una membrana ondulante que se muestra libre en su porción anterior. Los amastigotes son la forma replicativa que se encuentra en el interior de diversas células nucleadas de los mamíferos (figura 2). Su forma es ovoide, con núcleo centralizado y redondeado, de la bolsa flagelar emerge un flagelo muy corto; entre el núcleo y el flagelo se encuentra el cinetoplasto. Las formas alargadas del parásito en las cuales el cinetoplasto se encuentra ubicado anterior al núcleo se denominan epimastigotes, estos desde el punto de vista biológico son la forma replicativa en el intestino del insecto vector, se encuentran en el tubo digestivo del hospedero invertebrado (Brenner, 1973; dos Reis et al., 2012; Monteón et al., 2009; Rassi et al., 2010; Teixeira, Nascimento, & Sturm, 2006; Vianna Martins et al., 2012).

*T. cruzi* no es un parásito homogéneo, ya que genéticamente se agrupa en diferentes unidades discretas de tipificación, las cuales poseen diferente comportamiento biológico en lo que se refiere a curvas de parasitemia, interacción con las células del hospedero y capacidad de despertar la respuesta inmune del hospedero (Andrade et al., 1999; Cortez, Martins, et al., 2012; dos Reis et al., 2012; Monteón et al., 2009). Desde el punto de vista genético un consenso clasificó a *T. cruzi* en siete grupos o unidades discretas de tipificación (DTU – del inglés Discrete Typing Unit) (Zingales et al., 2012), describiendo la nomenclatura TcI, TcII, TcIII, TcIV, TcV y TcVI y Tc bat. Se define DTU como un conjunto de aislados que son semejantes genéticamente y que pueden ser identificados mediante marcadores moleculares e inmunológicos comunes (Andrade et al., 1999; Carrada-Bravo, 2004b; Ramírez et al., 2013; Vianna Martins et al., 2012; Zingales, 2011; Zingales et al., 2012).

## 1.4 CICLO DE VIDA

Figura 3. Ciclo de vida de *T. cruzi*.



Fuente: Bern, 2015.

*T. cruzi* es un parásito con un ciclo de vida complejo que incluye un hospedero invertebrado y uno vertebrado (figura 3). En la naturaleza, este ciclo inicia cuando el triatómino ingiere las formas tripomastigotas sanguíneas de un hospedero vertebrado infectado, a partir de allí los parásitos llegan a la porción anterior del estómago del hospedero invertebrado, donde se transforman en epimastigotes y algunas formas esferomastigotes. Las formas epimastigotes que sobreviven a la digestión alcanzan el intestino medio del vector, donde se multiplican y se adhieren a las microvellosidades del intestino mediante el flagelo. Seguidamente, se liberan de allí y hacen migración hacia el intestino posterior, donde se diferencian a tripomastigotes metacíclicos (forma infectante en el hospedero vertebrado),

fijándose a la cutícula que reviste el recto y el saco rectal del insecto. Posteriormente, cuando el insecto se alimenta de sangre, estas formas son eliminadas junto con las heces y orina del triatomino, sobre la piel o las mucosas de un hospedero vertebrado, en este último la penetración del parásito puede darse de manera directa a través de la membrana mucosa, heridas previas en la piel o por aquellas provocadas por el rascado en el lugar de la picadura (Coura & Borges-pereira, 2012; Vianna Martins et al., 2012).

Cuando los tripomastigotes metacíclicos ingresan al organismo del hospedero vertebrado, son fagocitados por células del sistema mononuclear fagocitario, a partir de ello se forma la vacuola parasitófora, donde el parásito se diferencia a su forma amastigota, posteriormente la membrana de la vacuola se rompe y dentro del citoplasma celular se multiplican. Luego del proceso replicativo, se transforma en tripomastigotes que son liberados en el medio extracelular, a partir de donde migran mediante el flujo sanguíneo a otras células para replicarse nuevamente. Cuando se da la lisis de la célula hospedera es posible que no se haya dado la diferenciación total de amastigotes a tripomastigotes, hecho por el cual es posible encontrar las dos formas en el medio externo, pudiendo ambas formas invadir nuevas células. Cuando el vector se alimenta, ocurre la ingestión de los tripomastigotes del parásito circulante en la sangre, recomenzando de esta forma el ciclo (Bern, 2015; Chagas, 1909; Rueda et al., 2014; Tyler & Engman, 2001).

## **1.5 VÍAS DE TRANSMISIÓN**

**1.5.1 Transmisión vectorial.** La principal ruta de transmisión de *T. cruzi* se encuentra relacionada con la presencia del parásito en las heces del insecto vector al momento de alimentarse de sangre del hospedero, siendo considerada como la principal vía de transmisión en los seres humanos, estimándose que alrededor del 70% de los casos de la infección en humanos ocurren por esta vía (Coura, 2015;

Coura & Junqueira, 2012), por esto es el mecanismo de transmisión de mayor importancia epidemiológica (Santana, 2015).

A pesar de todas las acciones que se han adelantado para el control de los triatominos en diversos países, sigue siendo una enfermedad altamente prevalente en áreas endémicas, donde se sigue trabajando para controlar los vectores como estrategia de prevención, control y vigilancia. Cabe destacar que en varios países esta vía de transmisión ha sido controlada, de hecho en Colombia algunos municipios han sido declarados libres de la presencia del vector domiciliado, sin embargo, aún continúa siendo un problema de salud pública (Browne et al., 2017; Durán, Siñani, & Depickère, 2014; León et al., 2015; Soto et al., 2014; Westphalen et al., 2012). De forma particular para esta vía de transmisión se reconoce que se da exclusivamente en el continente americano donde se han identificado más de 130 especies de triatominos, sin embargo, tan solo algunas de ellas son vectores competentes de *T. cruzi*. *Triatoma infestans*, *Rhodnius prolixus* y *Triatoma dimidiata* son las tres especies de vectores más importantes en la transmisión de *T. cruzi* al humano (Coura & Junqueira, 2012; Westphalen et al., 2012; WHO, 2009). Para Colombia se ha establecido la presencia de los vectores según el orden de importancia *Rhodnius prolixus*, *Triatoma dimidiata*, *Triatoma maculata* y *Triatoma venosa* (Guhl, Aguilera, Pinto, & Vergara, 2007).

**1.5.2 Transmisión por vía transfusional y trasplante de órganos.** La transmisión de la ECh por vía transfusional fue demostrada solo hasta el año 1952, a pesar de que ya había sido sugerida desde 1945 (Santana, 2015; Westphalen et al., 2012). En Brasil a partir de los primeros casos humanos de la infección pos transfusional por *T. cruzi* se evidenció una alta prevalencia en la década de 1950 promovida por la industrialización de este país y el éxodo rural consecuente. Se estima que para 1970 la alta tasa de individuos infectados en áreas urbanas de Brasil que alcanzó aproximadamente 20 mil nuevos casos estuvo relacionada con esta vía de transmisión (Coura, 2015).

Para los países no endémicos esta vía de transmisión se considera la principal forma de adquirir la infección (Angheben et al., 2015), a pesar de que el riesgo luego de trasfudir una unidad de sangre contaminada es menor al 10%, ya que se relaciona con diversos factores como la concentración del parásito, el hemocomponente que se transfunda e incluso la cepa del parásito (Rassi et al., 2010). Se sugiere que la transfusión plaquetaria aumenta el riesgo de la transmisión más que cualquier otro hemoderivado (Rodríguez-Félix et al., 1995).

Por su parte el trasplante de órganos ha aparecido como una nueva ruta para la transmisión de la enfermedad, en la cual los pacientes trasplantados desarrollan la fase aguda de la tripanosomiasis americana por cuenta de la inmunosupresión que afrontan tras el procedimiento (Gascon, Bern, & Pinazo, 2010; Schmunis, 2007).

**1.5.3 Transmisión vertical.** En los países endémicos la transmisión vertical representa un gran reto en los sistemas de salud, según la OMS se calcula que más de 8000 casos nuevos por año pueden presentarse por esta forma de transmisión. En países como Bolivia, Chile y Paraguay la transmisión congénita se da en el 5% de las mujeres embarazadas que padecen la forma crónica de la enfermedad, mientras que en el resto de países considerados endémicos esta tasa no alcanza el 1% (Rassi et al., 2010; Rueda et al., 2014).

**1.5.4 Transmisión oral.** La vía oral es considerada importante, principalmente en el ciclo selvático, donde es la ruta natural para la infección de los reservorios silvestres e incluso domésticos (Coura, 2015; Maria Aparecida Shikanai-Yasuda & Carvalho, 2012). En los seres humanos la infección por esta vía ocurre de manera inusual por consumo de frutas o alimentos contaminados o por ciertos aspectos culturales como el consumo de carne cruda o con poca cocción. Se reporta que la transmisión oral ha reemergido en regiones donde se ha adelantado el control vectorial, así como en zonas rurales y periurbanas de baja endemia, pudiendo probablemente ser explicados estos cambios epidemiológicos por desequilibrios

ecológicos, consecuencia de la destrucción de ecosistemas y la utilización de grandes extensiones de tierra para monocultivos, provocando que los vectores migren en busca de nuevas fuentes de alimentación (Díaz et al., 2015; Martins, Castanho, Nogueira, Silva, & Gusmão, 2011; Ríos et al., 2011; M A Shikanai-Yasuda et al., 1991; Triana & Suárez, 2014).

En los últimos años se ha dado un aumento en la incidencia de ECh agudo por transmisión oral en Brasil, Venezuela, Bolivia y Colombia (Díaz et al., 2015; Díaz & González, 2014; Noya et al., 2015; Ríos et al., 2011; Rueda et al., 2014; M A Shikanai-Yasuda et al., 1991). Generalmente la ECh agudo se presenta como microepidemias o microbrotes que aparecen de forma súbita, involucrando un bajo número de personas, en algunas ocasiones se han reportado casos aislados (Ramírez et al., 2013; Ríos et al., 2011; Triana & Suárez, 2014). La ocurrencia de los brotes ha sido reportada en sitios con ausencia de vectores en las viviendas, sin embargo, se han observado triatominos infectados en árboles, palmas y estructuras como gallineros que se encuentran en el peridomicilio. Adicionalmente, hay presencia de pequeños mamíferos, especialmente del género *Didelphis* en ambientes peridomésticos, y teniendo en cuenta que el ciclo de vida completo de *T. cruzi* puede llevarse a cabo dentro de las glándulas odoríferas de estos marsupiales, eventualmente podrían actuar como fuente potencial para la infección de personas sin la necesidad de la presencia del insecto vector (Díaz & González, 2014).

En el año 1965 se describió el primer brote de la enfermedad relacionado con la probable transmisión oral en Teutona, una localidad del estado de Rio Grande do Sul, Brasil, el cual involucró a 17 personas. Posteriormente han sido descritas microepidemias en diferentes estados del mismo país, dejando como resultado en el periodo de 1968 a 2005, 442 casos de los cuales 311 se presentaron como microbrotes. Durante el periodo comprendido entre el año 2000 a 2010 se reportaron más de 100 casos agudos en 138 brotes, éstos ocurrieron principalmente en regiones selváticas de la amazonia brasilera; el 71% (776) de estos casos se

han relacionado con la transmisión oral (Beilkisyolé, Colmenares, Ruiz-guevara, & Noya, 2010; Díaz & González, 2014; dos Reis et al., 2012; M A Shikanai-Yasuda et al., 1991; Shikanai-Yasuda & Carvalho, 2012). En Venezuela también han sido reportados recientemente casos de enfermedad de Chagas agudo asociados a transmisión oral en regiones costeras y occidentales del centro-norte de país, en los estados de Caracas, Vargas, Táchira, Mérida, Falcón y Miranda, en un periodo comprendido entre el año 2007 y 2014 (Noya et al., 2015).

En Colombia entre los años 1990 y 1999 fueron detectados dos brotes de ECh agudo asociados a miocarditis de posible transmisión oral, en Tibú, Norte de Santander, con seis casos confirmados; el segundo ocurrió en el municipio de Guamal, Magdalena. Posteriormente 10 nuevos casos fueron reportados entre 2002 y 2005, incrementándose notablemente en años siguientes, de modo que entre 2008 y 2012 se detectaron 64 nuevos casos agudos, de los cuales 60 se relacionaron con microbrotes (Díaz & González, 2014; Ríos et al., 2011; Rueda et al., 2014; Triana & Suárez, 2014). Llama la atención que de los nueve brotes registrados en toda Colombia, seis se presentaron en el departamento de Santander, en los municipios de Lebrija, Bucaramanga, Piedecuesta, San Vicente de Chucurí y Girón (Díaz & González, 2014).

## **1.6 MANIFESTACIONES CLÍNICAS**

Desde el punto de vista clínico, histopatológico y parasitológico pueden distinguirse 2 fases de la ECh, la fase aguda y la fase crónica. Se asume que dos terceras partes de los individuos que adquieren la infección nunca desarrollarán alguna manifestación clínica y que solamente cerca del 5% de los individuos con infección aguda presentan síntomas febriles, acompañados de dolor generalizado en las articulaciones, dolor muscular, malestar general, dolor de cabeza y algunos otros síntomas que pueden ser confundidos con un simple resfriado (Díaz & González, 2014; Pérez-Molina & Molina, 2018; Teixeira et al., 2006).

**1.6.1 Fase aguda.** Esta fase de la enfermedad está caracterizada por alta parasitemia, se inicia con la entrada de *T. cruzi* en el hospedero vertebrado (humano) pudiendo provocar lesiones en la piel (Chagoma) o en la conjuntiva (signo de Romana). La inespecificidad de los síntomas como fiebre, malestar general, hepato-esplenomegalia y linfocitosis atípica llevan usualmente a un sub-diagnóstico de la infección, estos signos suelen presentarse luego de 1 a 2 semanas de incubación (Dias et al., 2008; Rassi et al., 2010). Después de un periodo de 72 horas el parásito atraviesa ciclos de multiplicación y en la célula del hospedero se da la liberación de las formas infectantes en los espacios intercelulares, a partir de donde alcanzan los vasos sanguíneos circulando por el cuerpo. En cerca del 90% de los individuos infectados los síntomas asociados con la fase aguda desaparecen de forma espontánea. En esta fase la muerte sobreviene ocasionalmente (mortalidad entre <5 y 10%), como resultado de una miocarditis o meningoencefalitis grave en niños o personas inmunosuprimidas (Regueiro et al., 2013; Ríos et al., 2011; Rodriguez et al., 2014; Teixeira et al., 2006). Cuando la transmisión se da por la vía oral la fase aguda suele ser de un grado más alto de severidad (Díaz et al., 2015; Ramírez et al., 2013; Rueda et al., 2014).

**1.6.2 Fase crónica indeterminada.** Después de tres a seis meses los individuos infectados pasan a la forma crónica indeterminada de la infección, que está caracterizada por la ausencia de signos y síntomas. En esta fase, estarán entre el 60 y 70% de los pacientes, los cuales nunca desarrollaran sintomatología, y de los cuales solo se sospechará por nexos epidemiológicos y el diagnóstico por presencia de anti cuerpos anti-*T cruzi* (Rassi et al., 2010; Santana, 2015).

**1.6.3 Fase crónica sintomática.** Un tercio de los individuos infectados en un periodo de tres o más décadas después de la infección pueden presentar síntomas asociados a la ECh crónica presentándose alteraciones a nivel del corazón, esófago, colon o una combinación de estas. La gran mayoría de pacientes con cardiomiopatía chagásica crónica (95,5%) presentarán manifestaciones cardiacas

(miocarditis crónica) como cardiomegalia, insuficiencia cardíaca congestiva o arritmias que pueden llevarlos a la muerte. El 4,5% de los pacientes restantes, podrán presentar una forma digestiva, con síntomas relacionados con cuadros de megacolon o mega esófago (Flórez et al., 2010; Pérez-Molina & Molina, 2018).

## 1.7 DIAGNÓSTICO

Los análisis de laboratorio que están indicados para el diagnóstico de la ECh dependen básicamente de la fase de la enfermedad en la que se encuentre el individuo infectado, pueden ser de tres tipos: parasitológico, serológico y molecular. En la fase aguda de la enfermedad el diagnóstico por laboratorio se realiza preferiblemente mediante la detección directa de los parásitos en la sangre, los tripomastigotes móviles pueden detectarse mediante examen microscópico de sangre fresca anticoagulada, mediante la utilización de métodos parasitológicos directos como gota gruesa, método de Strout y microhematocrito observando el “buffy coat”,. Este último es el método de elección para identificar infección congénita debido a que presenta mayor sensibilidad y requiere menor cantidad de sangre (Gomes, Lorena, & Luquetti, 2009).

Por su parte, en la fase crónica (sintomática o indeterminada) las pruebas serológicas son de elección, dado que el bajo nivel de parásitos circulantes impide la detección microscópica. Dentro de éstos pueden encontrarse métodos serológicos como inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA), inmunofluorescencia indirecta (IFI), inmunocromatografía o hemaglutinación indirecta (HAI) los cuales permiten la detección de anticuerpos anti-*T. cruzi* de tipo IgG (Gomes et al., 2009).

Las técnicas moleculares son bastante eficientes en cualquiera de las dos fases de la enfermedad (Díaz & González, 2014; Duarte, Flórez, Rincón, & González, 2014; Pérez-Molina & Molina, 2018; Velázquez et al., 2014) y su utilización ha venido en aumento, sin embargo, la sensibilidad de la reacción en cadena de la polimerasa

(PCR) en la fase crónica de la enfermedad se hace variable debido a que depende de diversos aspectos como el volumen de la muestra, las condiciones en las cuales sea procesada, los iniciadores utilizados y las condiciones en que se lleve a cabo la amplificación (Buckner, Wilson, & Van Voorhis, 1999; Velázquez et al., 2014).

## **1.8 TRATAMIENTO**

Para la época en la que la ECh fue descubierta, fueron empleados varios tratamientos, la tintura de fucsina, atoxil (arsénico), tartrato emético (antimonio pentavalente) y el cloruro de mercurio, los cuales se mostraron ineficaces para combatir la infección (Santana, 2015). Hasta la fecha y poco más de un siglo después de que la enfermedad haya sido descrita no se dispone aún de un tratamiento farmacológico completamente eficaz. Entre 1960 y 1970 fueron introducidos los nitroderivados como alternativa terapéutica Benznidazol (N-benzil-2-nitro-1-imidazol acetamida) (Rochagan® e Radanil®, Roche; LAFEPE Benznidazol®) y Nifurtimox [4-(5-nitro-furilidenoamino-) tetrahidro-4-4-1, 4-tiazina-1-1-dióxido] (Lampit®, Bayer). Sin embargo, existe mucha discusión respecto al potencial benéfico en la eliminación del parásito con estos tratamientos ya que depende de la fase de la enfermedad en la que se proporcionen, la edad del paciente y otros factores. La indicación principal es que el tratamiento sea proporcionado al paciente tan pronto sea posible después de que diagnóstico sea confirmado, pues en la fase aguda el medicamento (benznidazol) se muestra muy eficaz para combatir la parasitemia, ya en la fase crónica el tratamiento no se indica dado que la eficiencia de este mismo no ha podido ser comprobada (Cevey et al., 2016; Luehring Fontes Martins, 2012; Manarin et al., 2013; Olmo et al., 2015). Se han descrito innumerables efectos colaterales que limitan la utilización de los medicamentos con acción tripanocida (Cevey et al., 2016).

## 1.9 MODELOS ANIMALES (RATA) PARA EL ESTUDIO DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS

Indudablemente los modelos animales han sido importantes para el conocimiento de muchas de las características de la enfermedad. En rata, en la cepa Wistar se ha reproducido la fase aguda de la infección con diferentes cepas del parásito, encontrando que la fase aguda se desarrolla tardíamente (alrededor de 3 semanas pos infección), mostrando variabilidad en la evolución de la parasitemia, llegando en algunos casos a la muerte de los animales (de Oliveira et al., 2007). Utilizando la cepa Y (TcII) se pudo verificar en ratas la presencia del parásito en varios tejidos, con cardiomiopatía y mega-colon como hallazgo frecuente (de Oliveira et al., 2007; Desquesnes & de Lana, 2010). Otros estudios desarrollados sobre la denervación simpática en ratas infectadas con la cepa Y de *T. cruzi* muestran que el proceso inicia más tempranamente (6 días pos infección) en paralelo con una parasitemia intensa e inflamación miocárdica (Labrador Hernández et al., 2008). En ratas Wistar infectadas con la cepa Colombiana (TcI) se detectaron algunas alteraciones electrocardiográficas similares a las observadas en los humanos, con excepción de un mayor bloqueo de rama derecha, estas alteraciones también fueron observadas en ratas infectadas con cepas Y y 12-SF (Melo & Machado, 2001). En la evaluación histopatológica de estos mismos animales se observó miocarditis crónica con fibrosis en el 15%. Estos resultados llevaron a que el modelo animal fuese recomendado para el estudio de la ECh. Cabe mencionar que la infección experimental en estos estudios se realizó por vía intraperitoneal (Chapadeiro et al., 1988; de Oliveira et al., 2007; Machado, 2013).

Buscando un mejor entendimiento de la respuesta inmune de las ratas frente a la infección aguda por *T. cruzi*, se estudió la contribución de los fagocitos mononucleares utilizando la cepa Y del parásito, encontrando que éste desencadena un incremento dramático del número de monocitos en sangre periférica en el día 12 de infección. En ese momento, el análisis histológico de los

corazones muestra un alto parasitismo y un proceso inflamatorio de moderado a intenso con infiltración de células mononucleares. Estudios ultraestructurales revelan la presencia de un gran número de macrófagos, junto con linfocitos y células indiferenciadas, los macrófagos muestran diferentes fenotipos morfológicos, con signos evidentes de activación (Melo & Machado, 2001). Estos hallazgos indican que la fase temprana de la infección por *T. cruzi* induce producción rápida, maduración y activación del sistema macrófago-monocito como mecanismo de control de la replicación del parásito (Melo & Machado, 2001). Estudios inmunológicos llevados a cabo en ratas infectadas con la cepa Sylvio X10/7 (Tcl) reportaron que durante la fase aguda de la infección, incluso 1,5 días pos inoculación cuando no puede ser detectado el parásito circulante en sangre y aún no se observa el infiltrado celular, el miocardio expresa altos niveles de óxido nítrico sintetasa (NOS), sin embargo, esto no es suficiente para evitar que el parásito se aloje en las células cardíacas (Chandrasekar, Melby, Troyer, & Freeman, 2000). En conjunto los resultados reportados anteriormente permiten ver que la rata es un buen modelo para el estudio de la ECh, tanto en su fase aguda como crónica.

## 2. JUSTIFICACIÓN

A pesar de que la transmisión de la ECh por vía oral ha sido reportada desde la primera mitad del siglo XX, en la última década ha cobrado especial atención por ser una vía reemergente en zonas no endémicas o en zonas donde los vectores domiciliados han sido controlados (Rueda et al., 2014). Adicionalmente, esta forma de transmisión se asocia con alta morbilidad y mortalidad representando un problema para los organismos de salud pública. De acuerdo con los reportes de la literatura, la vía oral como ruta de entrada del parásito se hace cada vez más importante en nuestro entorno, dado que muchos de los brotes reportados recientemente se presentaron en el departamento de Santander (Díaz & González, 2014; Hernández et al., 2008), con desenlaces fatales en varios casos.

Utilizando modelos animales varios autores han descrito que el curso clínico de la enfermedad puede variar por factores como la ruta de entrada del parásito y el tamaño del inóculo, modificando la severidad de la infección (Cortez, Martins, et al., 2012; Rodriguez et al., 2014; N. Suárez, Cabrera, Cartagena, & Ayaqui, 2009). Aunque en la naturaleza la vía oral es una ruta común de infección de reservorios silvestres, los estudios con modelos animales utilizan frecuentemente la inoculación del parásito por vía intraperitoneal (Camandaroba et al., 2002). Por lo tanto, no se conoce por completo el curso de la infección por vía oral, por ello este estudio plantea caracterizar el desarrollo de la ECh, especialmente la fase aguda, permitiendo conocer la dinámica de la infección por *T. cruzi* por vía oral.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar la fase aguda de la enfermedad de Chagas en ratas Wistar (*Rattus norvegicus*) infectadas experimentalmente por vía oral con *T. cruzi* I.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Evaluar el efecto del inóculo sobre la evolución de la parasitemia en ratas Wistar (*Rattus norvegicus*) infectadas experimentalmente por vía oral con *T. cruzi* I.
- Establecer la evolución de la parasitemia, los signos clínicos y los hallazgos histopatológicos presentados por ratas Wistar infectadas experimentalmente por vía oral con *T. cruzi* I.

## 4. MATERIALES Y MÉTODOS

### 4.1 POBLACIÓN DE ESTUDIO

**4.1.1 Cepa del parásito.** La cepa del parásito utilizada pertenece es un aislado de *Trypanosoma cruzi* perteneciente a DTU I (Tcl) obtenido de un paciente humano con cuadro agudo de la ECh, el cual fue caracterizado molecular y biológicamente (Díaz et al., 2015) en trabajos previos del grupo de Inmunología y Epidemiología Molecular (*GIEM*) de la Universidad Industrial de Santander UIS, llevados a cabo en el laboratorio central de investigaciones de la Facultad de Salud UIS.

**4.1.2 Animales.** Para el desarrollo de este estudio fueron utilizados un total de 75 ratas Wistar (*Rattus norvegicus*) procedentes del bioterio de la Facultad de Salud de la Universidad Industrial de Santander UIS. Fueron utilizadas ratas, macho al destete (21-25 días de edad) con un peso promedio de  $87,5 \pm 7,2$  g. Los animales fueron mantenidos con iluminación controlada (ciclo 12h día / 12h noche) en sala con temperatura  $21 \pm 2^\circ\text{C}$ . Todos los animales tuvieron libre acceso al agua y alimento.

**4.1.3 Inóculo.** Para la infección intraperitoneal fue utilizado un inóculo de  $5 \times 10^5$  tripomastigotes metacíclicos obtenidos por diferenciación en medio TAU3AAG (Referencia), que en experimentos llevados a cabo anteriormente por el laboratorio ha demostrado capacidad de desarrollar infección aguda.

Para la infección oral fueron utilizados inóculos de  $8 \times 10^5$ ,  $1,2 \times 10^6$  y  $2 \times 10^6$  tripomastigotes, de acuerdo a las recomendaciones más recientes de la literatura (Kuehn, Oliveira, Miranda, & Prado, 2014). Los parásitos fueron inoculados directamente en la boca del animal mediante la utilización de jeringa de insulina. Para todos los casos el inóculo estuvo contenido en un volumen de 0,2 ml con la

concentración del parásito requerida ( $8 \times 10^5$ ,  $1,2 \times 10^6$  y  $2 \times 10^6$ ) suspendidos en el medio TAU3AAG.

Para la evaluación de la infección experimental por *T. cruzi* por vía oral fue utilizado el inóculo  $1,2 \times 10^6$  el cual demostró el mejor comportamiento en términos de parasitemia patente.

## **4.2 OBTENCIÓN DE LAS MUESTRAS**

**4.2.1 Parasitemia.** Las parasitemias fueron medidas utilizando el método de Pizzi-Brener día por medio a partir del día 2 post infección hasta que en 3 mediciones consecutivas no se observaron parásitos en las muestras analizadas (excepto en elección de inóculo) posterior a ser positivo en parasitemia. Las muestras de sangre fueron colectadas en tubos capilares con heparina, posteriormente se tomaron de 5  $\mu$ l para el análisis por el método de Pizzi-Brener (Araújo-Jorge & de Castro, 2000).

**4.2.2 Tejidos.** Para la obtención de los tejidos se realizó eutanasia de los animales mediante cámara de  $\text{CO}_2$ . Los tejidos fueron almacenados en tubos conteniendo paraformaldehído al 10% para posterior fijación en parafina y tinción con hematoxilina- eosina. Todos los tejidos fueron llevados y procesados en el departamento de patología de la Facultad de Salud de la Universidad Industrial de Santander.

2 láminas de 5  $\mu$ m separadas por 20  $\mu$ m entre un corte y otro fueron analizadas para cada tejido de cada animal en cada momento (días 7, 14, 21, 38 y 44 post infección)

- Corazón (Aurícula y ventrículo)
- Colon (porción inicial)
- Músculo esquelético
- Estómago
- Esófago

### **4.3 VARIABLES ANALIZADAS**

**4.3.1 Parasitemia.** Según el método de Pizzi-Brener la parasitemia se obtiene a partir del análisis de 5  $\mu$ l de sangre extraída de la vena caudal, contando 50 campos para cada muestra, cuantificando el número de parásitos/campo microscópico, observados por toda el área de la laminilla. A partir de la parasitemia fueron derivados los siguientes parámetros.

- Pico máximo de parasitemia (PMP) Tripomastigotes/5 $\mu$ l
- Día de máxima parasitemia (DMP)
- Primer día parasitemia
- Ultimo día parasitemia

**4.3.2 Mortalidad.** Fue registrada la mortalidad diariamente y se expresará como porcentaje acumulado de mortalidad para cada grupo hasta el final de cada experimento.

### **4.3.3 Análisis histopatológico.**

**4.3.3.1 Presencia de nidos de amastigotes.** Para evaluar la presencia de nidos de amastigotes en los tejidos (Fabrino, Ribeiro, Teixeira, & Melo, 2011; Gibson-Corley, Olivier, & Meyerholz, 2013), las placas histopatológicas fueron observadas contando 40 campos por placa, teniendo en cuenta los siguientes parámetros:

Ausente: no se observan nidos

Leve: 1-5 nidos

Moderado: 6-10 nidos

Intenso: >10 nidos

**4.3.3.2 Presencia de infiltrado inflamatorio.** Para evaluar la presencia de infiltrado inflamatorio en los tejidos, las placas histopatológicas fueron observadas contando

40 campos por placa (Fabrino, Ribeiro, et al., 2011; Gibson-Corley et al., 2013), teniendo en cuenta los siguientes parámetros:

Infiltrado: 10 o más células inflamatorias/campo

Ausente: < 10 células por campo

Leve: 10-25 células/campo

Moderado: 26-50 células/campo

Severo: >50 células/campo

Todas las placas histopatológicas fueron observadas con una magnificación de 400X en microscopio óptico *NIKON Eclipse E100*.

#### 4.3.3.3 Distribución del infiltrado inflamatorio

La distribución del infiltrado inflamatorio fue evaluada siguiendo los siguientes parámetros:

- 0 Ausente
- 1 Focal
- 2 Multifocal
- 3 Difusa parcial
- 4 Difusa completo

Cuando se encontraron lesiones múltiples o se observó una marcada fibrosis o reemplazo de tejido adiposo, se agregaron 0,5 puntos al grado de distribución del infiltrado.

#### **4.3.4 Otras variables.**

**4.3.4.1 Peso.** El peso de los animales fue registrado semanalmente a partir de su llegada a la sala de experimentación y hasta el final del experimento.

### **4.4 GRUPOS EXPERIMENTALES**

**4.4.1 Elección del inóculo.** Para el experimento en el cual se buscaba determinar el inóculo capaz de provocar la mejor parasitemia patente fueron utilizados un total de 26 animales distribuidos de la siguiente forma.

- Animales infectados por vía oral (n=18) divididos en 3 grupos de 6 animales cada uno, inóculos de  $8 \times 10^5$ ,  $1,2 \times 10^6$  y  $2 \times 10^6$ .
- Animales infectados por vía intraperitoneal (n=4), inóculo  $5 \times 10^5$ .
- Animales no infectados (control negativo) (n=4).

**4.4.2 Evaluación de la infección experimental por T. cruzi por vía oral.** En este experimento fueron incluidos 26 animales utilizando para la infección experimental por vía oral el inóculo que en la primera fase mostró una mayor infección en términos de parasitemia patente ( $1,2 \times 10^6$ ).

- Animales infectados por vía oral (n=15)
- Animales infectados por vía intraperitoneal (n=8), inóculo  $5 \times 10^5$
- Animales no infectados (n=3)

**4.4.3 Evaluación de la infección experimental por T. cruzi por vía oral (repetición).** Un experimento adicional fue llevado a cabo con el fin de corroborar los datos obtenidos al utilizar el inóculo que en la primera fase mostró una mayor infección en términos de parasitemia patente ( $1,2 \times 10^6$ ) en la infección experimental por vía oral. Fueron incluidos en este experimento 23 animales.

- Animales infectados por vía oral (n=15)
- Animales infectados por vía intraperitoneal (n=8), inóculo  $5 \times 10^5$
- Animales no infectados (n=4)

#### **4.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

La normalidad de los datos fue evaluada utilizando la prueba de Shapiro-Wilk. Para la comparación de los diferentes grupos experimentales fue utilizado un análisis de la varianza –ANOVA OneWay- para la comparación de las medias del conteo de parásitos de cada grupo, seguido de prueba complementaria (Tukey o Dunns) para comparación múltiple entre las medias. Para las evaluar la asociación entre las variables categóricas fue utilizada la prueba de Chi cuadrado. Se estableció un nivel de confianza de 95% ( $p < 0,05$ ). Para el análisis de los datos fue utilizado Microsoft Excel, SigmaStat 4.0 y Stata 12.

#### **4.6 ASPECTOS ÉTICOS**

Para el desarrollo de este trabajo fueron tenidas en cuenta las normas establecidas en la Ley 84 de 1989, mediante la cual se establecen las normas científicas, técnicas y administrativas para la Investigación en salud, especialmente lo suscrito en el TITULO V en la que se regula la investigación con animales dispuesto en los artículos 87 al 94. De acuerdo con esta resolución este estudio se considera investigación “con riesgo mayor al mínimo”.

De igual forma se siguieron las recomendaciones de la *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* (Institute for Laboratory Animal Research, 2011), con el fin de garantizar el bienestar de los animales durante el desarrollo del proyecto de investigación

La disposición final de los residuos generados en la investigación, se realizó siguiendo lo establecido en el Decreto 351 de 2014, por medio del cual se reglamenta la gestión integral de los residuos generados en la atención en salud y otras actividades. Igualmente se acató lo dispuesto en el Plan de Gestión Integral de Residuos (PEGIR) de la UIS atendiendo en ambos casos lo estipulado para residuos biosanitarios, anatomopatológicos y cortopunzantes.

Todos los experimentos fueron aprobados por el Comité de Ética en Investigación Científica de la Universidad Industrial de Santander CEINCI-UIS como consta en acta N°3 del 3 de marzo de 2017.

## 5. RESULTADOS

### 5.1 ELECCIÓN DEL INÓCULO

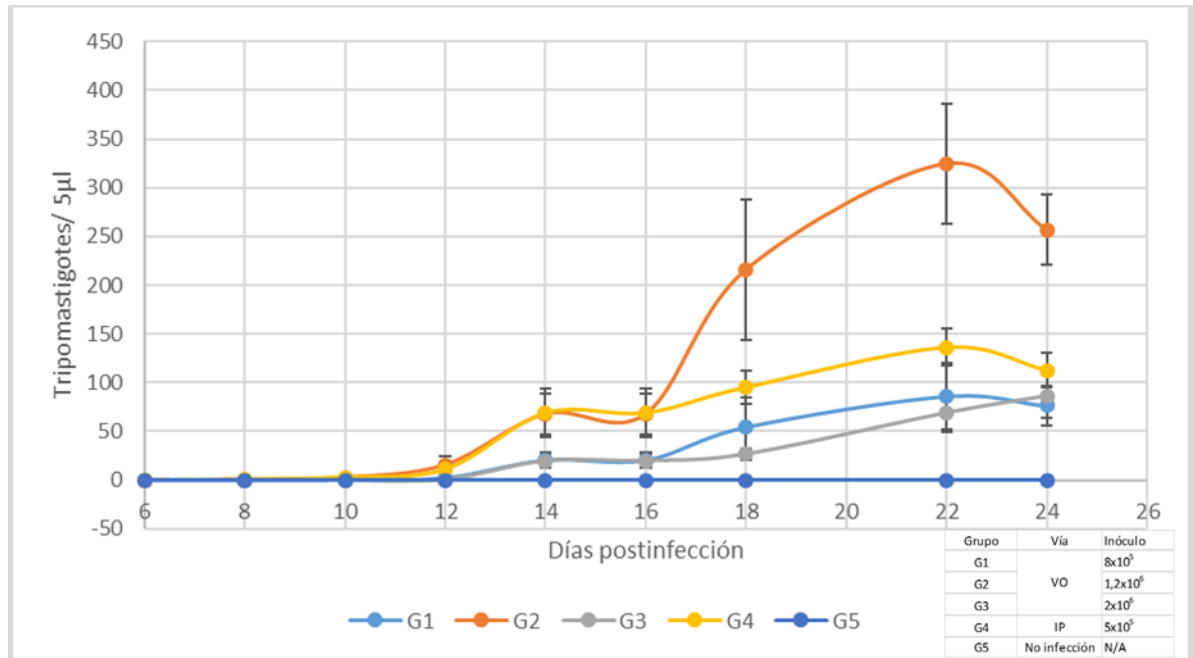
Con el objetivo de establecer el inóculo capaz de generar infección aguda en ratas infectadas experimentalmente por vía oral con *T. cruzi* se utilizaron tres inóculos de diferentes concentraciones de parásito (tripomastigotes metacíclicos)  $8 \times 10^5$ ,  $1,2 \times 10^6$  y  $2 \times 10^6$ . Adicionalmente como control positivo fueron infectados por vía intraperitoneal individuos con un inóculo de  $5 \times 10^5$ , estandarizado en trabajos previos del grupo de investigación. Para todos los experimentos se incluyó también un grupo control negativo, éste es, animales no infectados, inyectados por vía intraperitoneal con solución salina.

La confirmación de la infección en cada uno de los animales fue realizada mediante examen en fresco de la sangre periférica de los biomodelos, utilizando el método descrito por Pizzi-Brener. La sangre fue colectada por punción de la vena caudal y almacenada en tubo capilar heparinizado hasta el momento de la realización de la observación al microscopio. El análisis de la parasitemia fue llevado a cabo desde el día 2 post infección.

**5.1.1 Evolución de la parasitemia.** La figura 4 muestra la evolución de la parasitemia en los grupos inoculados experimentalmente por vía oral (G1, G2, G3) e intraperitoneal (G4). Los inóculos utilizados por vía oral fueron  $8 \times 10^5$ ,  $1,2 \times 10^6$  y  $2 \times 10^6$  respectivamente y  $5 \times 10^5$  para la infección intraperitoneal. Los datos corresponden al promedio  $\pm$  error estándar de la media (EEM) para cada grupo.

En este experimento la parasitemia fue medida hasta el día 24 postinfección, considerando que se había alcanzado el objetivo de encontrar el inóculo que por vía oral lograra generar la mejor infección aguda (G2  $1,2 \times 10^6$  tripomastigotes). A partir de ese día la parasitemia de los cuatro grupos empezó a descender (Figura 4).

Figura 4. Evolución de la parasitemia - experimento elección del inóculo



Se realizó el análisis estadístico para determinar si existían diferencias significativas entre los grupos a partir del día 12, momento en el cual todos los grupos mostraban parasitemia patente. En el análisis fueron encontradas diferencias significativas para las comparaciones entre los grupos G2 vs G5, y G4 vs G5 ( $p= 0,011$  para ambos casos), en los días 14 y 16, así mismo en los días 18 y 22 para las comparaciones entre los grupos G2 vs G5 solamente. Para el día 24, último día en el que se evaluó la parasitemia en este experimento, fueron observadas diferencias estadísticamente significativas entre los grupos G2 vs G5, G2 vs G1, G2 vs G3, ( $p=0,001$ ) y G2 vs G4 ( $p=0.008$ ).

**5.1.1.1 Primer día de parasitemia.** Para este experimento se reportó el día 8 postinfección como el primer día de parasitemia en el grupo infectado experimentalmente por vía intraperitoneal, con un conteo promedio de  $0,75 \pm 0,47$  tripomastigotes en  $5\mu\text{l}$ . Para el día 10 postinfección los 4 grupos mostraron parasitemia. Se realizó ANOVA OneWay de una vía encontrando que no existen

diferencias estadísticamente significativas entre los grupos infectados experimentalmente por vía oral e intraperitoneal para esta variable ( $p=0,064$ ).

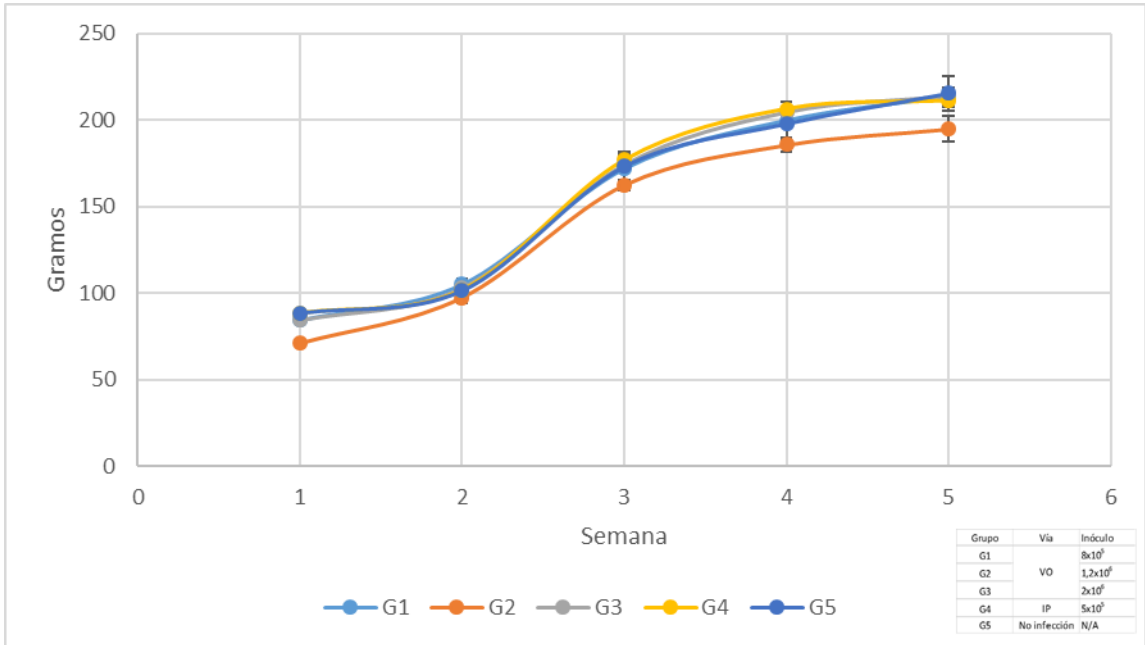
**5.1.1.2 Pico máximo de parasitemia.** El pico máximo de parasitemia fue alcanzado por el grupo 2 (G2), éste se infectó por vía oral con  $1,2 \times 10^6$  tripomastigotes, alcanzando un conteo promedio de  $324 \pm 61,84$  tripomastigotes sanguíneos en  $5\mu\text{l}$  de sangre. Para los grupos G1 y G3 el pico máximo de parasitemia fue de  $86,16 \pm 34,13$  y  $68,83 \pm 19,34$  tripomastigotes sanguíneos en  $5\mu\text{l}$  de sangre respectivamente. El pico máximo de parasitemia para el grupo inoculado por vía intraperitoneal alcanzó un promedio de  $136,25 \pm 19,30$  tripomastigotes sanguíneos en  $5\mu\text{l}$  de sangre. La prueba de ANOVA OneWay permitió establecer que existían diferencias estadísticamente significativas entre los grupos, posteriormente con una prueba para comparaciones múltiples (Dunn's) se establecieron diferencias entre los grupos G2 vs G1, G3 y G4 ( $p= 0,0034$ ), pero no entre las comparaciones múltiples entre los grupos G1, G3 y G4 ( $p>0,05$ ).

**5.1.1.3 Día de máxima de parasitemia (DMP).** El día de máxima parasitemia para los grupos G1, G2 y G4 fue el día 22 que coincidió para los 3 grupos, para el G3 fue el día 24. Para esta variable no se encontraron diferencias estadísticamente significativas ( $p>0,05$ ).

**5.1.2 Peso.** El peso de los animales fue registrado semanalmente desde el ingreso a la sala de experimentación, una semana antes de la inoculación.

La figura 5 muestra la evolución del peso de los animales a lo largo del experimento. El análisis estadístico (ANOVA OneWay) mostró diferencias significativas entre el peso de los animales de los grupos G2 vs G4 ( $p<0,05$ ) para la semana 1, 2 y 3. En la semana 4 no se encontraron diferencias. Para la semana 5 fueron encontradas diferencias estadísticamente significativas entre el peso de los animales de los grupos G2 vs G4 y G2 vs G5 ( $p=0,043$ ).

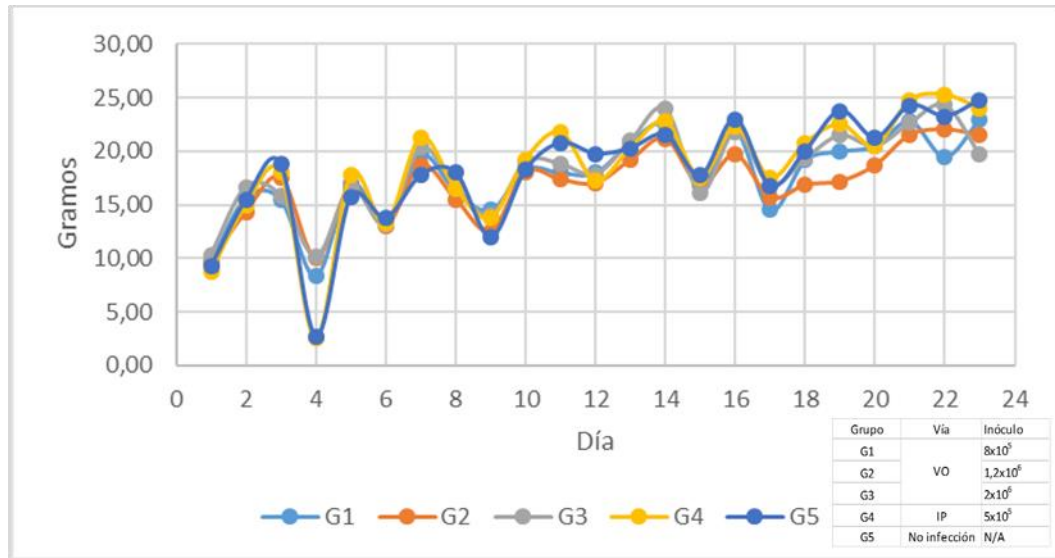
Figura 5. Evolución del peso - experimento elección del inóculo



**5.1.3 Consumo de alimento.** El consumo de alimento de los animales fue registrado desde el momento de la inoculación y hasta el día 24 postinfección.

La figura 6 muestra la evolución del consumo de alimento a lo largo del experimento. El análisis estadístico no mostró una diferencia significativa en el consumo de alimento entre los grupos evaluados ( $p > 0,005$ ). Sin embargo, como se observa en la gráfica el grupo G2 entre el día 18 y 22 presentó una disminución del consumo de alimento que coincide con el pico de parasitemia mostrado por este grupo.

Figura 6. Consumo de alimento - experimento elección del inóculo



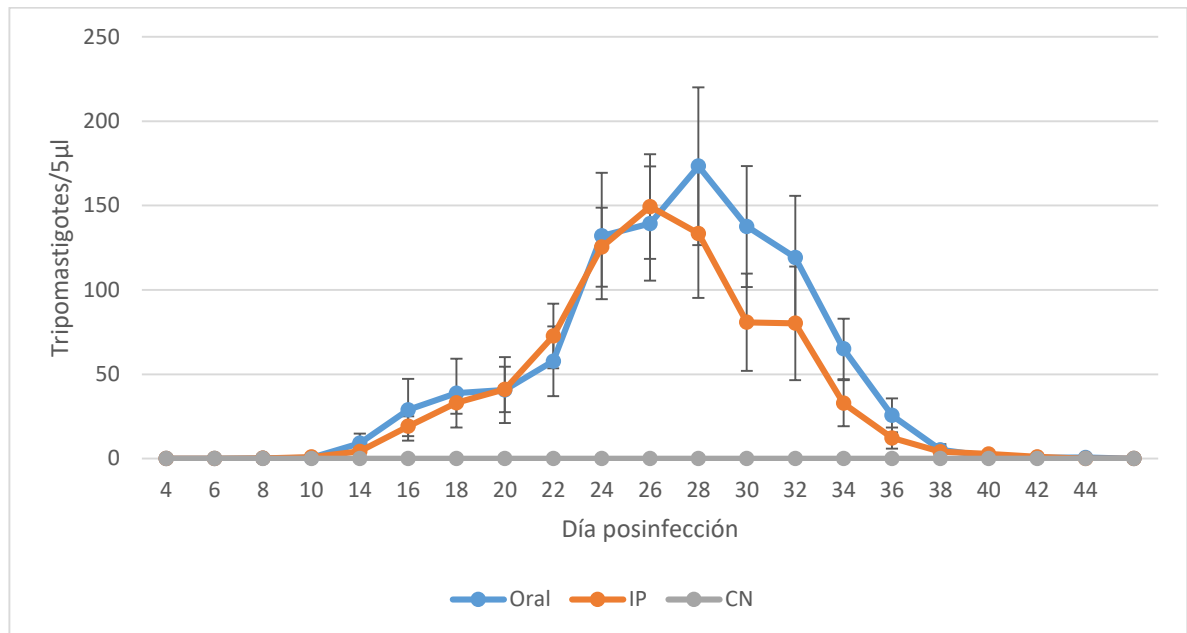
## 5.2 EVALUACIÓN DE LA INFECCIÓN EXPERIMENTAL CON *T. Cruzi* Por Vía Oral

Para evaluar la fase aguda de la ECh en ratas Wistar infectadas experimentalmente por vía oral con *T. cruzi* I fue elegido el inóculo de  $1,2 \times 10^6$  tripomastigotes, este inóculo generó la mayor parasitemia patente en la elección del inóculo. Fueron utilizados 30 animales infectados por vía oral, 16 animales por vía intraperitoneal ( $5 \times 10^5$  tripomastigotes) y 7 animales como control negativo. Los datos se muestran como la media  $\pm$  EEM de 2 experimentos consecutivos llevados a cabo por separado. La comparación de la media de tripomastigotes, peso y consumo de alimento de los 2 experimentos mostró que no existen diferencias estadísticamente significativas por lo cual los datos fueron analizados en conjunto.

**5.2.1 Evolución de la parasitemia.** El primer análisis describe la evolución de la parasitemia e incluye tanto los animales infectados por vía oral (oral) como los infectados por vía intraperitoneal (IP) (Figura 7). La efectividad de la infección para

la vía oral fue de 73,3 % (22/30) y para la vía intraperitoneal fue de 81,25% (13/16). La mayor parasitemia fue alcanzada por el grupo oral.

Figura 7. Evolución de la parasitemia



**5.2.1.1 Primer día de parasitemia.** El primer día de parasitemia tanto para el grupo infectado por vía oral como para el infectado por vía intraperitoneal fue el día 8, día en el cual por lo menos 1 animal mostró por lo menos 1 tripomastigote sanguíneo en el análisis. Para esta variable se realizó ANOVA OneWay (Kruskal-Wallis para comparaciones múltiples) encontrando que no existen diferencias estadísticamente significativas ( $p=0,648$ ) para la parasitemia en el primer día entre los grupos evaluados.

**5.2.1.2 Pico máximo de parasitemia.** El pico máximo de parasitemia fue alcanzado por el grupo oral  $173,33 \pm 46,78$  tripomastigotes/  $5\mu\text{l}$ . Para el grupo IP el pico máximo de parasitemia fue de  $149,4 \pm 33,90$  tripomastigotes/ $5\mu\text{l}$ . Se estableció que existían diferencias estadísticamente significativas entre el control negativo y los grupos IP y Oral ( $p=0,034$ ), no así entre estos dos últimos.

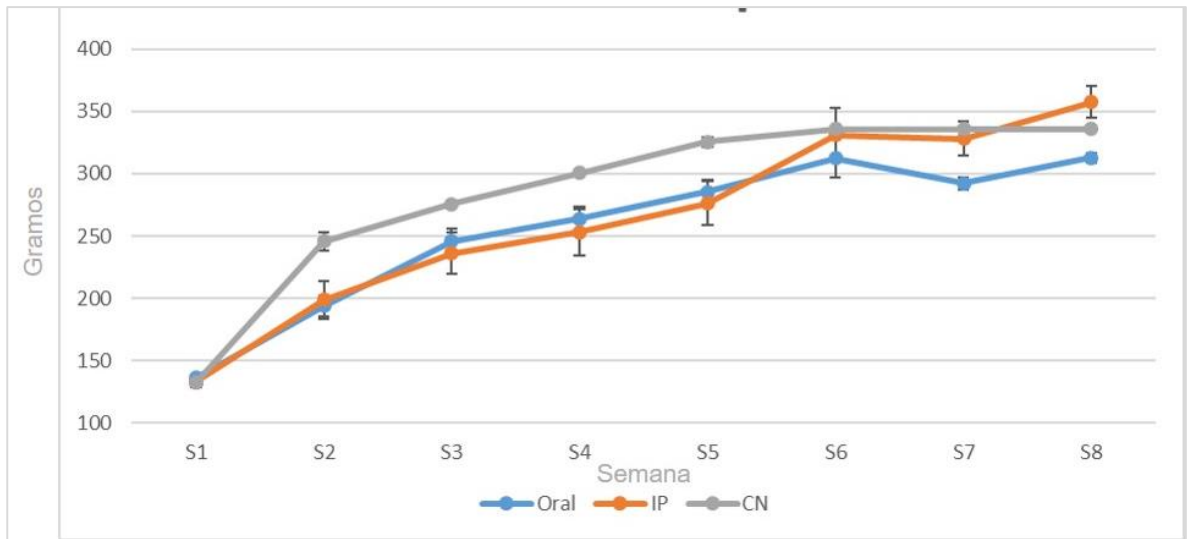
**5.2.1.3 Día de máxima de parasitemia (MPP).** El grupo IP alcanzó la máxima parasitemia para el día 26 postinfección, por su parte el grupo oral alcanzó la máxima parasitemia el día 28 postinfección (gráfica 7). No se encontraron diferencias estadísticamente significativas ( $p= 0,684$ ) entre estos grupos para esta variable.

**5.2.1.4 Día de última parasitemia.** La parasitemia en el grupo oral se extendió hasta el día 42 postinfección, mientras que para el grupo IP se pudo evaluar solo hasta el día 40 postinfección.

**5.2.2 Peso.** El peso de los animales fue registrado semanalmente desde el ingreso a la sala de experimentación, una semana antes de la inoculación. Los datos mostrados en la figura 8 corresponden a la media  $\pm$  EEM para cada grupo. Oral (n=30) animales inoculados por vía oral con  $1,2 \times 10^6$  tripomastigotes, IP (n=16) animales inoculados por vía intraperitoneal con  $5 \times 10^5$  tripomastigotes, CN (n=7) animales no inoculados con parásitos.

La figura 8 muestra la evolución del peso para el experimento de la fase II, el análisis estadístico (ANOVA OneWay) mostró que no existen diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) para los animales de los grupos Oral, IP y CN en las semanas 1 a la 6. Las diferencias estadísticamente significativas en el peso pudieron ser observadas para las semanas 7 y 8 entre los grupos Oral vs IP y Oral vs CN ( $p < 0,05$ ).

Figura 8. Evolución del peso



**5.2.3 Análisis histopatológico.** El análisis histopatológico incluyó la evaluación de 5 tejidos: Corazón (aurícula y ventrículo), esófago, estómago, colon y músculo esquelético. Para cada uno de estos tejidos fueron evaluadas las variables: presencia de infiltrado inflamatorio (ausente, leve, moderado y severo), tipo de infiltrado (ausente, monocitos, neutrófilos, mixto), distribución del infiltrado en músculo liso, cardiaco y esquelético (Fabrino, Ribeiro, et al., 2011; Gibson-Corley et al., 2013), presencia de nidos de amastigotes (ausente, leve, moderado e intenso) y número de nidos de amastigotes. Para este experimento fueron evaluados 3 grupos Oral (n=30) animales inoculados por vía oral con  $1,2 \times 10^6$  tripomastigotes, IP (n=16) animales inoculados por vía intraperitoneal con  $5 \times 10^5$  tripomastigotes, CN (n=7) animales no inoculados con parásitos. Un total de 298 placas histopatológicas fueron analizadas en este experimento. Con el fin de evaluar la evolución de la infección fueron llevadas a cabo eutanasias secuenciales de forma aleatoria en los días 7, 14, 21, 38 y 44 postinfección. Dado el reducido tamaño de muestra para el grupo IP en este grupo no se realizó eutanasia al día 38. Todos los animales del grupo CN fueron eutanasiados el día 44.

A continuación, se presentan la descripción de los hallazgos mediante tablas de contingencia y gráficos de barras.

La tabla 1 muestra la distribución de muestras de cada tejido que fueron incluidos en el análisis. Un total de 298 placas histopatológicas fueron analizadas bajo microscopio de luz.

Tabla 1. Cantidad de tejidos analizados (%)

Vía de infección	Colon %	Cor_aur %	Cor_ven %	Esófago %	Estómago %	Músculo %	Total %
<b>Oral</b>	17,9	15,8	15,4	9,5	20,4	20,9	67,4
<b>IP</b>	17,7	15,2	15,2	10,1	22,8	19,0	26,5
<b>CN</b>	16,7	16,7	16,7	16,7	16,7	16,7	6,0
<b>Total</b>	17,8	15,8	15,4	10,1	20,8	20,1	100,0

La tabla 2 muestra la distribución de las muestras de tejido analizadas para cada grupo incluido en este estudio, el 26,51% corresponde a muestras de animales infectados por vía intraperitoneal (IP/7, 14, 21, 44), el 67,45% corresponde a muestras de tejidos provenientes de animales infectados por vía oral (VO/7, 14, 21,38, 44), el restante (6,04%) corresponde a los tejidos analizados provenientes de animales del grupo control negativo (CN).

La tabla 3 muestra la distribución del infiltrado inflamatorio por vía de infección, la mayor distribución del infiltrado en todos los grupos fue de grado leve, independiente de la vía de infección.

Tabla 2. Distribución de los tejidos analizados (%) por vía de infección y evolución de la infección.

<b>Grupo*</b>	<b>% tejidos</b>
<b>CN</b>	6,04%
<b>IP/7</b>	6,71%
<b>IP/14</b>	4,36%
<b>IP/21</b>	8,39%
<b>IP/44</b>	7,05%
<b>VO/7</b>	16,11%
<b>VO/14</b>	17,11%
<b>VO/21</b>	13,42%
<b>VO/38</b>	4,03%
<b>VO/44</b>	16,78%
<b>TOTAL</b>	<b>100%</b>

\* Hace referencia a la vía de infección y al día postinfección en que se realizó la eutanasia, así IP/7 indica animales infectados por vía intraperitoneal a los cuales se les realizó eutanasia el día 7 postinfección.

Tabla 3. Presencia de infiltrado inflamatorio asociado a la vía de infección

<b>Vía de infección</b>	<b>Ausente %</b>	<b>Leve %</b>	<b>Moderado %</b>	<b>Severo %</b>	<b>Total %</b>
<b>Oral</b>	16,4	60,2	19,9	3,5	100
<b>IP</b>	27,8	32,9	27,8	11,4	100
<b>CN</b>	83,3	16,7	0,0	0,0	100
<b>Total</b>	23,5	50,3	20,8	5,4	100

Las figuras nueve y diez muestran la presencia de infiltrado inflamatorio para cada uno de los grupos (Intraperitoneal y oral) evaluados según el día postinfección, en este experimento la eutanasia de los animales en distintos momentos postinfección buscó evaluar la evolución de la infección, el parámetro presentado aquí evalúa la “severidad” del infiltrado en los distintos tejidos evaluados. En la imagen 1 puede observarse un ejemplo de la evaluación del infiltrado inflamatorio en cortes histológicos de tejido cardiaco. Se realizó una prueba de Chi cuadrado para establecer la relación que existe entre la vía de inoculación, la evolución de la infección (día de eutanasia) vs la presencia de infiltrado inflamatorio (severidad).

Cuando se compararon los días 7, 14, 21 y 44 postinfección para los animales infectados por vía intraperitoneal se encontraron diferencias estadísticamente significativas ( $p=0,00047$ ) para la presencia de infiltrado inflamatorio dependientes del día postinfección. Por su parte cuando se compararon los días 7, 14, 21, 38 y 44 postinfección para los animales infectados por vía oral no se encontraron diferencias estadísticamente significativas ( $p=0,414$ ). Posteriormente se procedió a comparar ambas vías de infección (IP vs Oral) para cada uno de los días postinfección, encontrando diferencias estadísticamente significativas para los días 7, 21 y 44 ( $p= 0,000045, 0,047$  y  $0,0020$  respectivamente), no así para el día 14 ( $p=0,625$ ).

Figura 9. Presencia de infiltrado inflamatorio asociado a la evolución de la infección en animales infectados por vía intraperitoneal

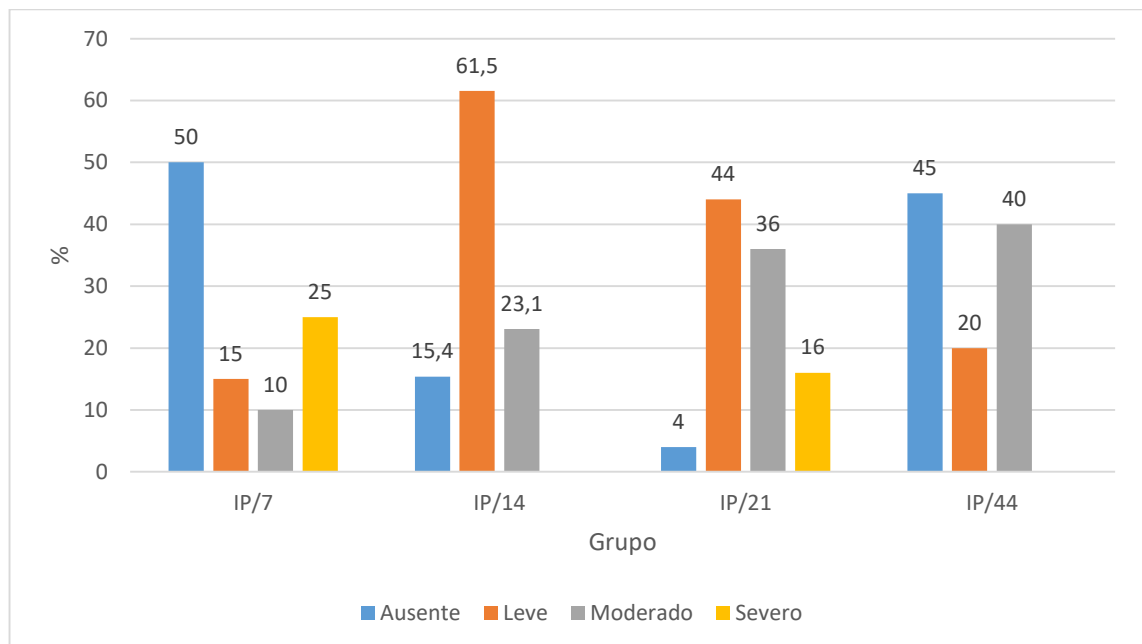


Imagen 1. Presencia de infiltrado inflamatorio. A) leve. B) Moderado. C) Severo.

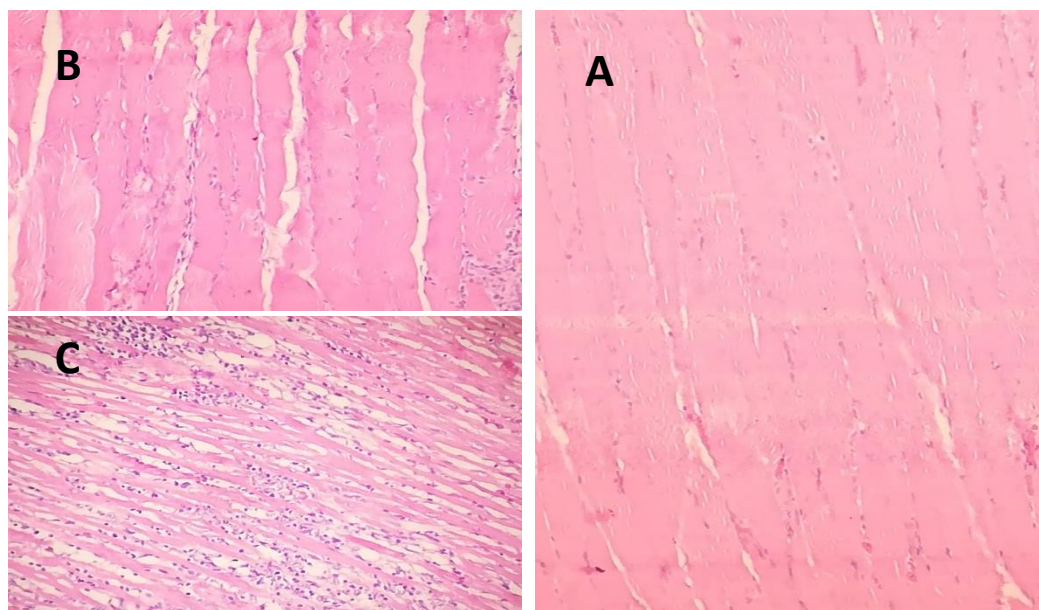
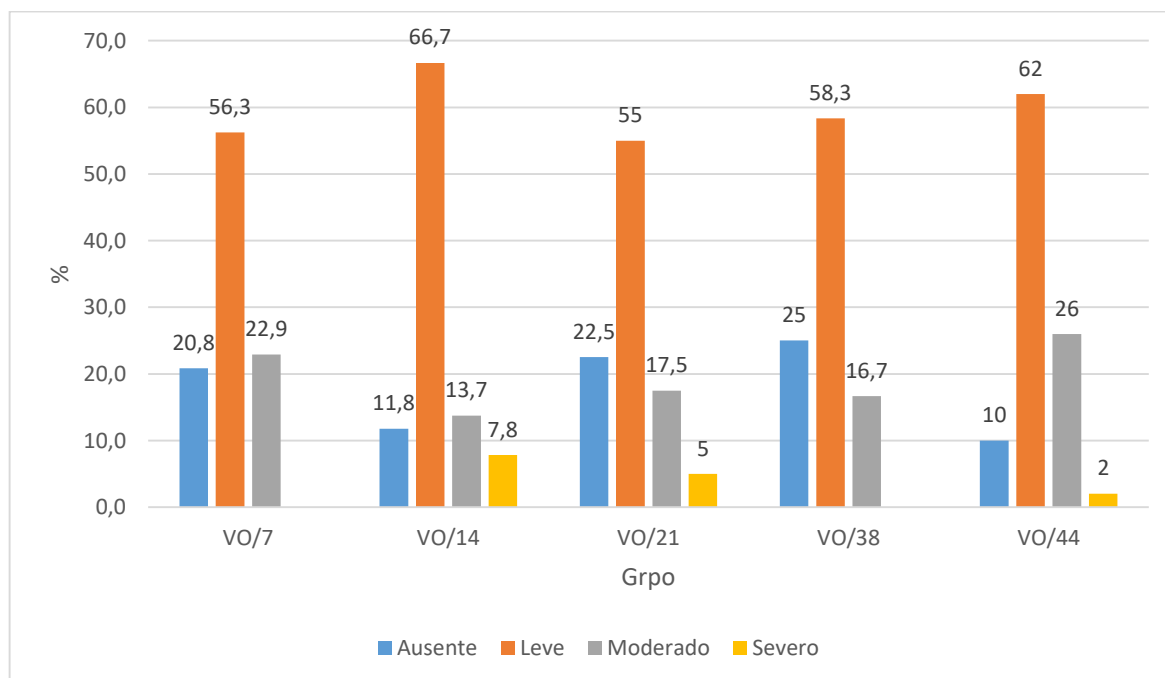


Figura 10. Presencia de infiltrado inflamatorio asociado a la evolución de la infección en animales infectados por oral



Las figuras 11 y 12 muestran la distribución del infiltrado inflamatorio para cada uno de los grupos evaluados asociado a la evolución de la infección. Se realizó una prueba de Chi cuadrado para establecer la relación que existe entre la vía de inoculación y la evolución de la infección con la distribución del infiltrado inflamatorio. Cuando se compararon los días 7, 14, 21 y 44 postinfección para los animales infectados por vía intraperitoneal se encontraron diferencias estadísticamente significativas ( $p=0,0043$ ) para la distribución del infiltrado inflamatorio dependientes del día postinfección. Por su parte cuando se compararon los días 7, 14, 21, 38 y 44 postinfección para los animales infectados por vía oral no se encontraron diferencias estadísticamente significativas ( $p=0,71$ ). Posteriormente se procedió a comparar ambas vías de infección (IP vs Oral) para cada uno de los días postinfección en que se evaluó la evolución de la infección, encontrando diferencias estadísticamente significativas para los días 7 y 44 ( $p= 0,00073$  y  $0,013$  respectivamente). Para los días 14 y 21 no se encontraron diferencias ( $p=0,94$  y  $0,10$  respectivamente).

Figura 11. Distribución del infiltrado inflamatorio asociado a la evolución de la infección en animales infectados por vía intraperitoneal

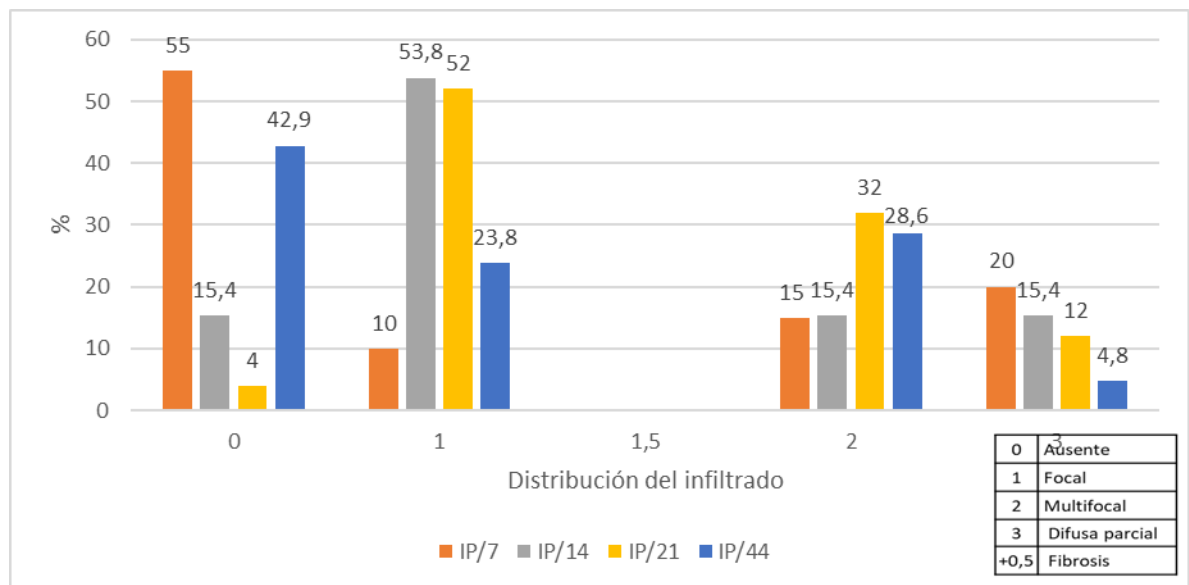
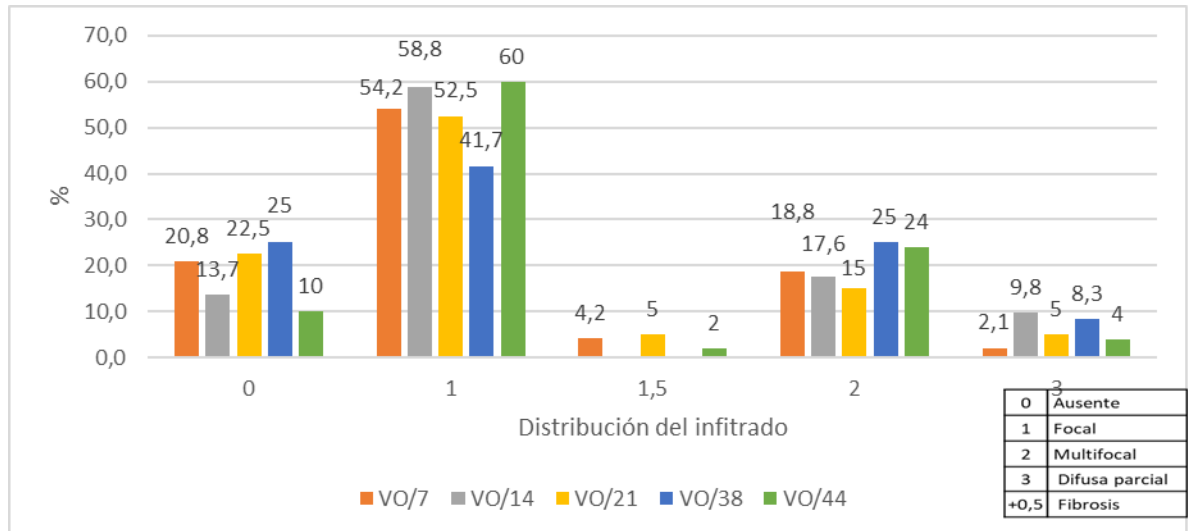


Figura 12. distribución del infiltrado inflamatorio asociado a la evolución de la infección en animales infectados por oral



Las figuras 13 y 14 muestran la presencia de nidos de amastigotes (Ausente, leve, moderado e intenso) para cada uno de los grupos evaluados asociado a la evolución de la infección. La imagen 2 muestra la evaluación de la presencia de nidos de amastigotes en tejidos evaluados. Se realizó una prueba de Chi cuadrado para establecer la relación que existe entre la vía de inoculación y la evolución de la infección (día de eutanasia) vs la presencia de nidos de amastigotes. Cuando se compararon los días 7, 14, 21 y 44 postinfección tanto para los animales infectados por vía intraperitoneal como por vía oral no se encontraron diferencias estadísticamente significativas ( $p=0,77$  y  $0,48$  respectivamente) para la presencia de nidos de amastigotes asociado a la evolución de la infección. Posteriormente se procedió a comparar ambas vías de infección (IP vs Oral) para cada uno de los días postinfección evaluados, encontrando diferencias estadísticamente significativas para el día 44 ( $p= 0,0486$ ). Para los días 7, 14 y 21 no se encontraron diferencias ( $p=0,36$ ,  $0,13$  y  $0,28$  respectivamente).

Figura 13. Presencia de nidos de amastigotes por vía de infección asociado a la evolución de la infección (IP)

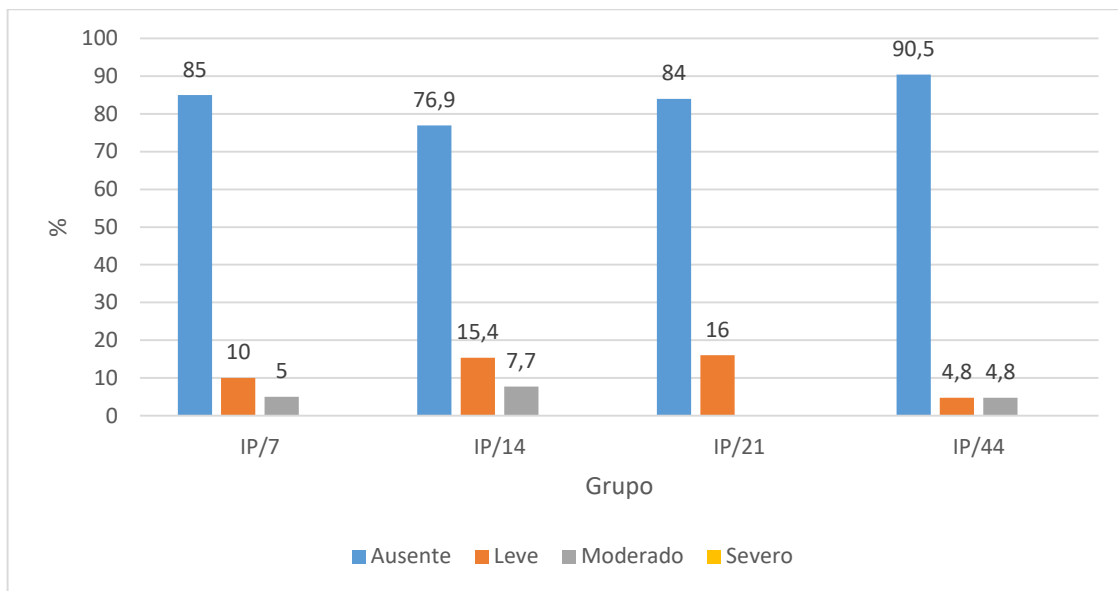


Figura 14. Presencia de nidos de amastigotes por vía de infección asociado a la evolución de la infección (VO)

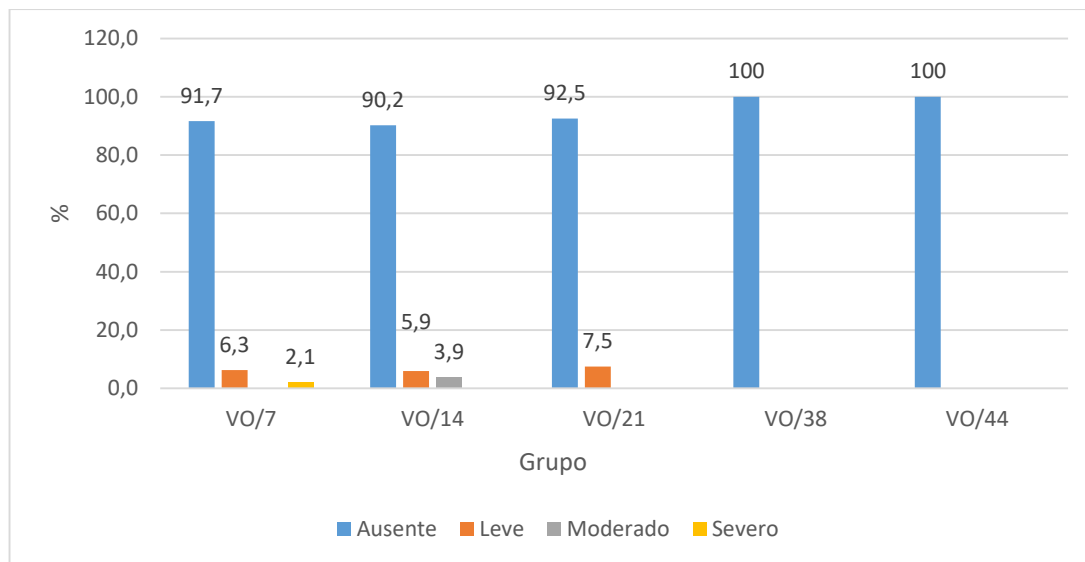
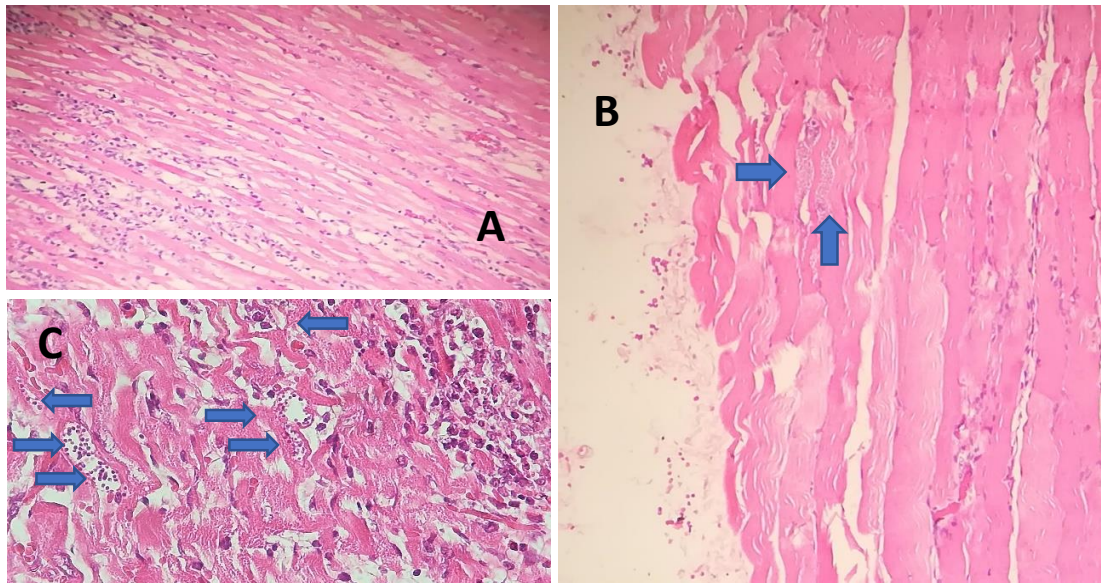
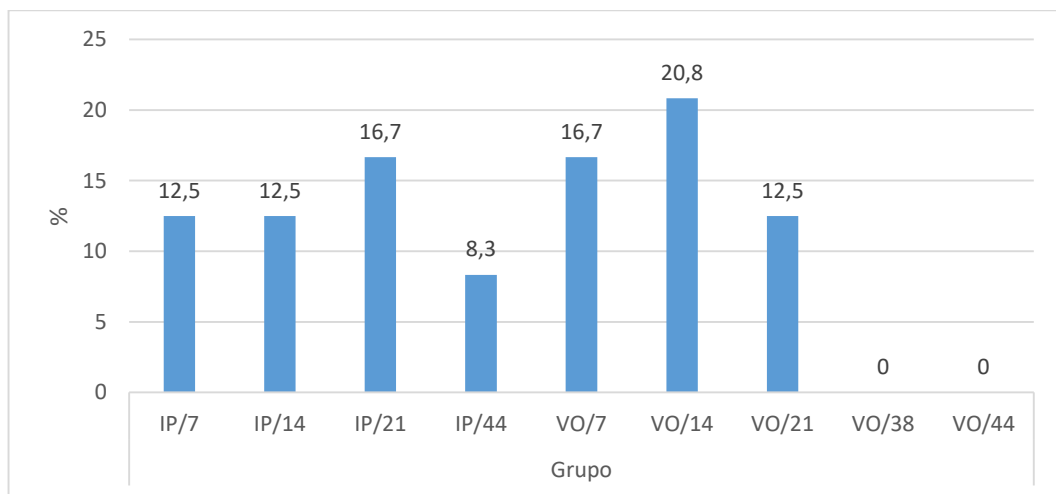


Imagen 2. Presencia de nidos de amastigotes en los tejidos. A) Ausente (0 nidos). B) Leve (1-5 nidos). C) Moderado



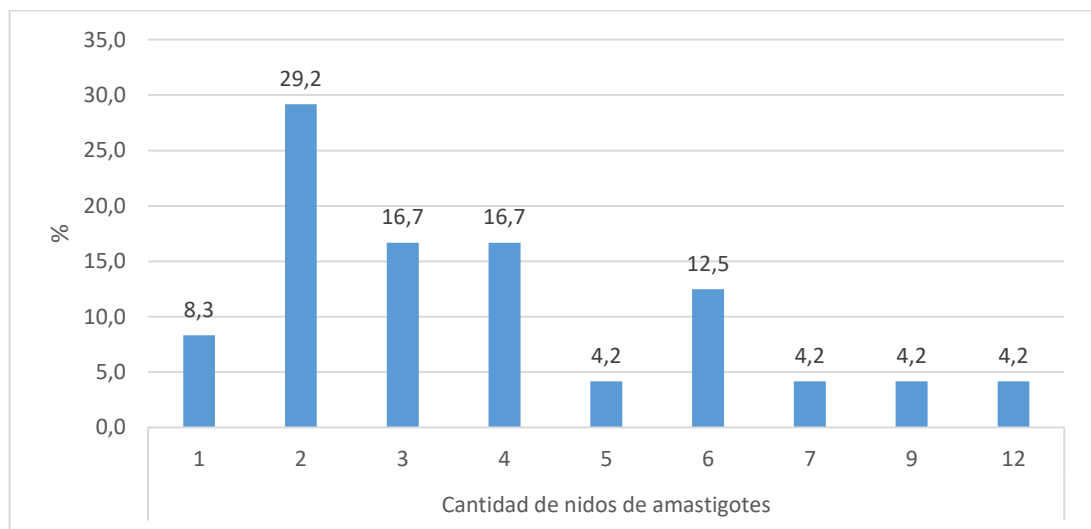
La figura 15 muestra la distribución de la presencia de nidos de amastigotes asociado a la vía de infección y a la evolución de la parasitemia. Fueron identificados 24 tejidos con presencia de nidos, 50% corresponden a animales infectados por vía intraperitoneal y 50% a animales infectados por vía oral.

Figura 15. Distribución de la presencia de nidos de amastigotes asociado a la vía de infección y a la evolución de la parasitemia.



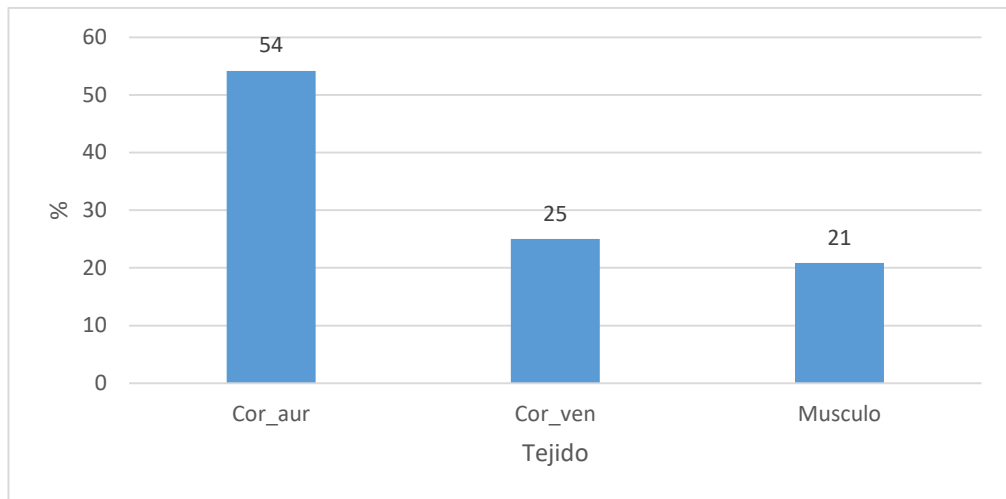
La figura 16 muestra la distribución de la cantidad de nidos encontrados en los diversos tejidos independiente de la vía de infección. Dos fue el número de nidos encontrados con mayor frecuencia (29,2%) en los tejidos (corazón y músculo esquelético) La mayor cantidad de nidos encontrados en un tejido fue 12 (4,2%), en un animal inoculado por vía oral (VO/7).

Figura 16. Cantidad de nidos de amastigotes independiente de la vía de infección y evolución de la parasitemia.



En la figura 17 se muestra la distribución (%) de la presencia de nidos de amastigotes en los diferentes tejidos independiente de la vía de infección y la evolución de la infección. Puede verse que la aurícula es el tejido donde más comúnmente se encontraron nidos de amastigotes (54%), seguido del ventrículo (24%) y músculo esquelético (21%). En colon, estómago y esófago fueron tejidos en los que no se encontró presencia de nidos de amastigotes.

Figura 17. Nidos de amastigotes por tejido (independiente de la vía de infección)



## 6. DISCUSIÓN

A pesar de que la vía oral es la ruta de infección natural en la vida silvestre, el modelo animal en la mayoría de los estudios utilizan la vía intraperitoneal, subcutánea e intradérmica como ruta de infección, las cuales reproducen las características de la infección vectorial (Kuehn et al., 2014; Malaquias Dias, Gruending, Marques Araújo, Gomes, & de Ornelas Toledo, 2013). Para el modelo de infección experimental por vía oral todavía no están totalmente establecidas las condiciones, como por ejemplo el tamaño del inóculo, la evolución de la parasitemia, la tasa de infección, entre otros (Andrade et al., 1999; Cortez, Martins, et al., 2012). Adicionalmente, el animal más empleado es el ratón, siendo la utilización de la rata más limitada en estos estudios (Graefe et al., 2003; Malaquias Dias et al., 2013; Morrison, Roelants, Mayor-Withey, & Murray, 1978). En los seres humanos la fase aguda de la enfermedad todavía no está totalmente comprendida, debido a los pocos casos estudiados, donde las fuentes principales de estudio son casos de infección accidental en laboratorio y casos de infección congénita. Por otra parte, la corta duración de esta fase y la presentación de una sintomatología tan inespecífica que puede pasar desapercibida, limitan el conocimiento de la fisiopatología. Los modelos animales han permitido descubrir que, como en las dos primeras semanas tras la infección, justo antes de que la parasitemia patente llegue a su pico y descienda, el organismo se defiende mediante los mecanismos de la respuesta inmune innata o inmunidad natural, donde se destaca una marcada respuesta inflamatoria (Araújo-Jorge & de Castro, 2000; Barreto-de-Albuquerque et al., 2015).

La selección de la vía de infección oral se realizó para poder replicar y estudiar en un modelo animal la fase aguda de la ECh por transmisión oral, dado que se encuentran pocos reportes en la literatura. A pesar de que se ha descrito una mayor resistencia a la infección de la rata comparada con el ratón (Mogollón, Moreno, & Yarbuh, 2012), ésta presenta la ventaja de un mayor tamaño que permite realizar análisis ecocardiográficos y evaluar el efecto de diferentes manejos terapéuticos de

posible aplicación en los pacientes en fase aguda de la enfermedad. Contar con este modelo permitirá además evaluar la fisiopatología de la infección por vía oral, las lesiones que conducen al daño cardíaco, la dinámica de la respuesta inmune, entre otros. A pesar de todos los estudios realizados sobre ECh en modelos animales y seres humanos, para la vía oral aún quedan algunas cosas sin entender respecto a su fisiopatología, variación en la prevalencia y en la severidad de la infección en individuos expuestos a una fuente común de infección, lo que indica un amplio rango de susceptibilidad individual y un marcado efecto dependiente de la cepa y el inóculo del parásito. (Barreto-de-Albuquerque et al., 2015; Cortez, Martins, et al., 2012).

Por otra parte, el modelo podría también ofrecer la posibilidad de realizar estudios que lleven hasta la fase crónica de la infección por *T. cruzi* por vía oral, lo que reviste importancia en el sentido que se ha demostrado que la vía de inoculación y severidad de la infección oral tienen una relación directa con la progresión y pronóstico de la fase crónica. En la infección oral se ha descrito que las formas infectivas de *T. cruzi* invaden el epitelio de la mucosa gástrica resistiendo la acidez gástrica mediante la expresión de proteínas de superficie altamente resistentes a la proteólisis. La expresión de la proteína gp82 en la superficie del parásito contribuye a que los tripomastigotes se unan a la mucina gástrica y a partir de allí migren atravesando la capa mucosa invadiendo células epiteliales (Cortez, Yoshida, Bahia, & Sobreira, 2012; Díaz & González, 2014), a pesar de esto, en este estudio no logró evidenciarse la presencia de parásitos en tejido estomacal de animales infectados por la vía oral en ninguno de los momentos en los que fue evaluada la evolución de la infección (días 7, 14, 21, ,38 y 44). Varios autores han demostrado la interacción parásito-mucosa en los modelos animales de infección oral (intragástrico, faríngeo o bucal), encontrando que se presenta tanto parasitemia patente como parasitismo cardíaco, lo que indica infección sistémica, sin embargo, tampoco se reporta la presencia del parásito en los tejidos de la vía de entrada (Barreto-de-Albuquerque et al., 2015).

Este estudio permitió establecer el modelo de Chagas agudo en ratas Wistar inoculadas por vía oral, siendo el inóculo de  $1,2 \times 10^6$  tripomastigotes el que permitió obtener el mayor número de parásitos en el día 22 postinfección (64,8 tripomastigotes/mm<sup>3</sup>). Este valor es mayor a lo reportado por otros estudios realizados en ratas utilizando otras vías como la intradérmica (9 y 17,5 tripomastigotes/mm<sup>3</sup>; 14,3 a 55,2 tripomastigotes/mm<sup>3</sup>) aunque con tamaños de inóculo diferentes, utilizando las cepas Y y Planalto respectivamente. (Moreno et al., 2006; Mogollón et al., 2012) y por vía intraperitoneal (12,2 tripomastigotes/mm<sup>3</sup>) utilizando la cepa Planalto (Alarcón et al., 2006). Las diferencias en los parámetros de los protocolos reportados (tamaño del inóculo, edad de los animales, cepas del parásito) representan la principal dificultad para poder comparar los resultados en este tipo de estudios, dado que ellas podrían conferir características diferentes a la dinámica de la infección (de Oliveira et al., 2007; Zingales, 2011).

En este estudio la efectividad de la infección para la vía oral utilizando el inóculo de  $1,2 \times 10^6$  tripomastigotes fue de 73,3 % (22/30) y para la vía intraperitoneal fue de 81,25% (13/16), este parámetro que aquí se presenta no es comúnmente reportado en muchos estudios, sin embargo, animales (ratas Wistar) inoculados por vía intraperitoneal e intradérmica con diferentes inóculos y cepas del parásito han demostrado alcanzar una efectividad de la infección que varía desde 7% hasta el 100% (Kuehn et al., 2014; Mogollón et al., 2012; E. Moreno, Añez, Scorza, Lugo De Y, & Borges, 1999; Elio a Moreno et al., 2006).

La evolución del peso y el consumo de alimento son dos variables que solo algunas investigaciones que involucran modelos animales para el estudio de la ECh reportan (de Oliveira et al., 2007), a pesar de que podrían ser dos variables asociadas al curso de la infección como signos clínicos reportados en pacientes humanos (dos Reis et al., 2012; Noya et al., 2015). En esta investigación se encontró en el experimento de la elección del inóculo que existían diferencias estadísticamente significativas para el grupo con el inóculo de  $1,2 \times 10^6$  tripomastigotes, grupo en el

que el inóculo logró generar la mayor parasitemia. En la segunda fase del experimento no se encontraron diferencias significativas en la evolución del peso entre los grupos inoculados por las diferentes vías, oral, IP y CN en las primeras seis semanas. Sin embargo, se observaron diferencias estadísticamente significativas en las semanas 7 y 8 entre los grupos oral comparado con intraperitoneal y oral comparado con el control negativo. Esto podría llevar a plantear que el modelo animal reproduce las características clínicas de la ECh humana, ya que la severidad de la infección (en términos de signos clínicos) es mayor cuando la infección se transmite por vía oral que cuando es por vía vectorial (Beilkisyolé et al., 2010; Díaz & González, 2014; Ríos et al., 2011).

Pueden encontrarse en la literatura diversos reportes sobre la evaluación de las alteraciones en tejidos provocadas o inducidas por infecciones experimentales con *T. cruzi* evaluando diferentes modelos animales, vías de inoculación (Andrade et al., 1999; Buckner et al., 1999; de Oliveira et al., 2007; Dias da Silva, Ribeiro Machado, Moraes Rocha, Marques Padilha, & Ramirez, 2003; Fabrino, Ribeiro, et al., 2011) tamaños de inóculo (Andrade et al., 1999; Barreto-de-Albuquerque et al., 2015; Chapadeiro et al., 1988; Cortez, Martins, et al., 2012; E. Moreno et al., 1999), entre otros. En ésta investigación fueron incluidos análisis histológicos de corazón (aurícula y ventrículo), esófago, estómago, colón y músculo esquelético provenientes de animales infectados por vía intraperitoneal y por vía oral, con inóculos  $5 \times 10^5$  y de  $8 \times 10^5$ ,  $1,2 \times 10^6$  y  $2 \times 10^6$  respectivamente. Desde el punto de vista inmunológico existen varias hipótesis que pueden explicar las diferencias entre la infección oral y vectorial, se sugiere que el primer contacto entre la mucosa y el parásito promueve una respuesta inmune tipo Th2 y al mismo tiempo produce IgA, que es responsable de la protección frente al parásito (Kuehn et al., 2014). En la infección oral el estómago representa la principal barrera para que los tripomastigotes metacíclicos puedan invadir el epitelio de la mucosa gástrica y de esta forma alcanzar las células diana, puede suponerse que las formas metacíclicas están equipadas con moléculas de superficie tipo mucina, por lo cual

el nivel de parasitemia alcanzado está directamente relacionado con la mayor o menor expresión de estas y la mayor o menor producción local de anticuerpos (Cortez, Martins, et al., 2012; Cortez, Yoshida, et al., 2012), limitando de esta forma la invasión y replicación de *T. cruzi*, comparado con la infección intraperitoneal en la cual los parásitos son fagocitados directamente por los macrófagos, los cuales facilitan la replicación y difusión en el organismo, estos mecanismos podrían entonces explicar las diferencias encontradas en los niveles de parasitemia y alteraciones patológicas asociados a la vía de infección (Camandaroba et al., 2002).

Los hallazgos para las variables analizadas en este estudio revelan que, para la presencia de infiltrado inflamatorio evaluado aquí como ausente, leve, moderado y severo se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los animales infectados por vía oral e intraperitoneal ( $p=0.0047$ ). Consistente con estos hallazgos, diversos autores (Andrade et al., 1999; Buckner et al., 1999; Teixeira et al., 2006) han encontrado que la distribución y presencia del infiltrado inflamatorio está influida por variables como cepa del parásito, modelo animal, inóculo, día postinfección, vía de inoculación, lo cual podría explicar que se encuentre presencia de infiltrado inflamatorio de diferente intensidad en los tejidos incluidos de los grupos evaluados, esto probablemente podría asociarse a la capacidad diferencial de provocar la respuesta inmune en el huésped, o la capacidad que tiene el parásito de evadir el sistema inmune.

En la fase aguda de la enfermedad la ruptura de los nidos de amastigotes provoca la destrucción de las células conllevando a un proceso inflamatorio especialmente en el corazón, la intensidad de la respuesta inflamatoria está ligada a la cantidad de parásitos que invaden los cardiomiocitos, a la capacidad de respuesta del sistema inmune del individuo (Fabrino, Leon, Genestra, Parreira, & Melo, 2011) y a las características biológicas del parásito, de hecho, diversos estudios han demostrado que estas diferencias relacionadas con las características biológicas de *T. cruzi* pueden ayudar a entender tanto la patogénesis como las manifestaciones clínicas

de la enfermedad (Martins et al., 2012). Después de que la infección con *T. cruzi* se establece, varias células inmunes son activadas mediante glucoproteínas específicas del hospedero, de este modo, los macrófagos, las células T y las citoquinas trabajan en conjunto para tratar de controlar la replicación del parásito durante la infección (Fabrino, Leon, et al., 2011). La inmunidad innata es la primera línea de defensa frente a la invasión del microorganismo, las células del linaje monocítico se involucran directamente en el control de la infección en las fases tempranas de la infección con *T. cruzi* (Kuehn et al., 2014).

Llama la atención que en la evaluación histopatológica del tejido cardíaco se encontró en la totalidad de ellas algún grado de infiltrado inflamatorio, lo que apoya la hipótesis de que el corazón es un órgano altamente afectado en la fase aguda de la ECh y además, que el modelo estudiado en esta investigación reproduce, tanto las características de la enfermedad observadas en otros modelos animales (Chapadeiro et al., 1988; de Oliveira et al., 2007; Fabrino, Leon, et al., 2011; Machado, 2013) como la evolución de la enfermedad en seres humanos.

Los datos obtenidos en este estudio correspondientes a la severidad del infiltrado, el tipo de infiltrado, el número de nidos encontrados en los diferentes tejidos de acuerdo con la evolución de la infección y la vía de inoculación, se relacionan directamente con la capacidad de respuesta inmune tanto innata como adaptativa del huésped, en las cuales diferentes tipos de células y moléculas se involucran en la respuesta a la infección experimental con *T. cruzi*. Lo observado aquí demuestra que en general los diversos componentes de la respuesta inmune están relacionados con la vía de infección y a partir de ello los mecanismos inmunes desencadenados por el parásito en el huésped dependen seguramente de los patrones celulares y moleculares derivados del *T. cruzi* y que son reconocidos por receptores específicos que modulan la respuesta inmune, todo esto permite explicar las diferencias encontradas entre los individuos infectados por vía oral vs los

inoculados por vía intraperitoneal. (Díaz & González, 2014; Hernández et al., 2008; Parada & Carrasco, 1997; Postan, Arnaiz, & Fichera, 1999; Regueiro et al., 2013).

Otra de las variables analizadas fue la presencia de nidos de amastigotes, se determinó la presencia “severidad” de nidos de amastigotes en los tejidos (ausente 0 nidos, leve 1 a 5 nidos, moderado 6 a 10 nidos, severo >10 nidos), se encontró que en el 75% de los casos los nidos encontrados se presentaban con severidad leve, seguido de moderado (16,6%) y severo (8,3%). Se encontró un máximo de 12 nidos en un mismo tejido (de 1 animal inoculado por vía oral) seguido de 9, 7 y 5 nidos (8,33% para cada uno), el restante 66,68% de los nidos se presentaban en cantidad de 1, 2 y 3 nidos por tejido. Los nidos fueron encontrados en cortes histológicos correspondientes a corazón y musculo esquelético. Se comparó la cantidad de nidos de amastigotes entre las dos vías de infección, encontrando diferencias estadísticamente significativas en el día 44 postinfección ( $p= 0,046$ ) encontrándose más nidos en animales que se infectaron por la vía intraperitoneal. Estos datos son consistentes con diversos estudios que, tanto en rata como en ratón, reportan la presencia de nidos de amastigotes en diversos tejidos s (Alarcón et al., 2006; Andrade et al., 1999; Buckner et al., 1999; Chandrasekar et al., 2000; Chapadeiro et al., 1988; E. A. Moreno et al., 2006; Elio Moreno et al., 2002; Rodriguez et al., 2014). En la infección por *T. cruzi* existen diversos mecanismos de respuesta inmune dependientes tanto de la capacidad de respuesta del hospedero como de las características genéticas del parásito que provocan una marcada diferencia en la evolución de la infección, lo que puede ser visto en la distribución del infiltrado inflamatorio, los órganos que son afectados y en los cuales se encuentran nidos de amastigotes, el momento de la infección en que se encuentran las lesiones y la inflamación en los diversos tejidos que son analizados, sin embargo, se sabe que durante las etapas iniciales de la infección, la activación de macrófagos y células dendríticas por patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP) llevarán a la activación de estas células y a la consecuente producción de IL-12, esta a su vez induce la síntesis de IFN-gamma que aumenta

la síntesis de la misma IL-12, TNF-alfa y óxido nítrico (NO) de los macrófagos lo que contribuye con la eliminación del parásito. Homologar los hallazgos en modelos animales a los humanos representa en si una serie de limitaciones, sin embargo, los estudios en animales permiten establecer muchos aspectos conceptualmente importantes de la infección, en donde se destaca el papel crucial de la respuesta inflamatoria en el establecimiento de los mecanismos inmunomediados que controlan el desenlace de la infección (Carrada-Bravo, 2004a; Teixeira et al., 2006).

Dada la ausencia de estudios que utilicen la rata como modelo para el estudio de la ECh por infección oral no se encuentra una referencia que establezca si existen o no diferencias entre los dos modelos, por lo cual al menos esta variable no puede ser directamente comparable con los reportes de literatura, los resultados de este estudio muestran que es posible reproducir el modelo de infección oral por *T. cruzi* en ratas, demostrando que existen diferencias en el comportamiento y evolución de la infección dependientes de la vía de infección (al menos en las variables analizadas), de este modo, esta investigación aporta datos valiosos para el estudio de la fase aguda de la infección oral en modelos animales y establece un modelo que *a posteriori* podría usarse para estudios de la fase crónica de la enfermedad o de enfoques terapéuticos.

La evaluación del tipo celular (ausente, mononuclear, mixto) presente en el infiltrado inflamatorio de todos los tejidos analizados mostró un predominio (>95%) de infiltrado mononuclear, tanto para los animales infectados por vía intraperitoneal como por vía oral (Tabla 4), lo cual era de esperarse, debido a que en la fase aguda de la ECh se genera una fuerte respuesta inflamatoria la cual busca de manera rápida controlar el parásito, de esta forma los monocitos son reclutados notablemente y juegan un papel fundamental. Los datos obtenidos en este estudio son consistentes con un buen modelo para el estudio de la ECh (fase aguda) ya que desde el punto de vista del tipo celular involucrado en el proceso inflamatorio el modelo se asemeja a alguno de los aspectos de la infección en seres humanos,

incluyendo el infiltrado inflamatorio a nivel cardiaco, principal órgano diana de *T. cruzi*, se observa que existe una respuesta diferencial en términos del infiltrado inflamatorio dependiente de la vía de infección y la evolución de la infección (tabla 3) .

La cepa del parásito utilizado en este estudio (Tc 1) provenía de un caso con desenlace fatal en paciente humano con infección aguda, en el modelo animal, sin embargo, no se reportó mortalidad de ninguno de los individuos infectados por ninguna de las dos vías, como se ha mencionado, la severidad y la evolución de la infección dependen de múltiples características tanto del huésped como del parásito, lo que podría explicar este hecho de la mortalidad.

Finalmente es importante resaltar que cada modelo animal para el estudio de la ECh depende de una gran cantidad de variables, inherentes tanto al hospedero como al parásito. En esta investigación fue posible evaluar la fase aguda de la ECh en ratas Wistar infectadas experimentalmente por vía oral, de modo que los parámetros aquí utilizados deberán ser tenidos en cuenta para la reproducción del modelo en estudios posteriores.

## 7. CONCLUSIONES

- El estudio demuestra que es posible reproducir la fase aguda de la ECh mediante la infección experimental con *T. cruzi* I por vía oral en ratas Wistar.
- Los inóculos de  $8 \times 10^5$ ,  $1,2 \times 10^6$  y  $2 \times 10^6$  fueron capaces de generar infección aguda por vía oral, sin embargo, fue el inóculo de  $1,2 \times 10^6$  el que provocó la mayor parasitemia patente.
- Los hallazgos histopatológicos demuestran la presencia del parásito en tejido cardíaco y musculo esquelético de animales infectados tanto por vía oral como por vía intraperitoneal, sin embargo, la ausencia de nidos de amastigotes en esófago, estómago y colon de los animales infectados por vía oral representa nuevos desafíos en el modelo de infección oral que permitan explicar la dinámica de la infección relacionada con los efectos a nivel de estos órganos.
- La vía de infección puede modificar la dinámica de la enfermedad y por ende los signos clínicos y la severidad de la infección, las diferencias entre los hallazgos en parasitemia, infiltrado inflamatorio, presencia y número de nidos de amastigotes entre los animales infectados por vía intraperitoneal y vía oral así lo demuestran.

## 8. RECOMENDACIONES

- Evaluar la dinámica celular y de citoquinas en el modelo de infección experimental por *T. cruzi* por vía oral en ratas Wistar.
- Establecer las características del modelo en la fase crónica de la infección.
- Tener en cuenta las características de la cepa del parásito, de los animales, el inóculo y otras para la reproducibilidad del modelo.
- Identificar la presencia de alteraciones patológicas en órganos afectados por el parásito (corazón) en la infección experimental por vía oral.

## BIBLIOGRAFÍA

ALARCÓN, Maritza, et al. Presencia de Trypanosoma Cruzi En Tejidos de Ratas Wistar Inyectadas Experimentalmente y Sus Fetos. Boletín de Malariología y Salud Ambiental XLVI(2). 2006.

ANDRADE, Luciana O., et al. Differential Tissue Distribution of Diverse Clones of Trypanosoma Cruzi in Infected Mice. Molecular and Biochemical Parasitology 100(2), 1999. p.163–72. Doi: 10.1016/S0166-6851(99)90035-X.

ANGHEBEN, Andrea, et al. Chagas Disease and Transfusion Medicine: A Perspective from Non-Endemic Countries. Blood Transfusion 13(4), 2015. p.540–50. Doi: 10.2450/2015.0040-15

ARAÚJO-JORGE, Tania C. y Solange L. de Castro. Doença de Chagas : Manual Para Experimentação Animal. Editora FI. Rio de Janeiro: Antropologia e Saúde collection. 2000.

BARRETO-DE-ALBUQUERQUE, Juliana, et al. Trypanosoma Cruzi Infection through the Oral Route Promotes a Severe Infection in Mice: New Disease Form from an Old Infection?. PLoS Neglected Tropical Diseases 9(6), 2015. p.1–21. Doi: 10.1371/journal.pntd.0003849

BEILKISYOLÉ, Alarcón De Noya, Cecilia Colmenares, Raiza Ruiz-guevara, and Oscar Noya. La Transmisión Oral En La Enfermedad de Chagas. Revista de la Facultad de Medicina 33(2), 2010. p.78–86.

BERN, Caryn. Chagas' Disease. New England Journal of Medicine 373(5), 2015. p.456–66. Doi: 10.1056/NEJMra1410150.

BRENER, Zigman. Biology of Trypanosoma Cruzi. Annual Reviews in Microbiology 27(1), 1973. p.347–82.

BROWNE, Annie J., et al. Data Descriptor: The Contemporary Distribution of Trypanosoma Cruzi Infection in Humans , Alternative Hosts and Vectors. Scientific Data, 2017. p.1–9.

BUCKNER, Frederick S.; WILSON, Aaron J. y VAN VOORHIS, Wesley C. Detection of Live Trypanosoma Cruzi in Tissues of Infected Mice by Using Histochemical Stain for  $\beta$ -Galactosidase. Infection and Immunity 67(1), 1999. p.403–9.

CAMANDAROBA, Edson Luiz; PINHEIRO LIMA, Clarissa M. y ANDRADE, Sonia G. Oral Transmission of Chagas Disease: Importance of Trypanosoma Cruzi Biodeme in the Intra-gastric Experimental Infection. Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo 44(2), 2002. p.97–103. Disponible en: <https://doi.org/10.1590/S0036-46652002000200008>.

CARRADA-BRAVO, Teodoro. Trypanosoma Cruzi : Historia Natural y Diagnóstico de La Enfermedad de Chagas. Revista Mexicana de Patología Clínica 51(4), 2004. p.205–19.

———. Trypanosoma Cruzi: Historia Natural y Diagnóstico de La Enfermedad de Chagas. Rev Mex Patol Clin 51(4), 2004. p.205–19.

CEVEY, Ágata Carolina, et al. Low-Dose Benznidazole Treatment Results in Parasite Clearance and Attenuates Heart Inflammatory Reaction in an Experimental Model of Infection with a Highly Virulent Trypanosoma Cruzi Strain. International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance 6(1), 2016. p.12–22. Doi: 10.1016/j.ijpddr.2015.12.001.

CHAGAS, Carlos. Nova Tripanozomiaze Humana: Estudos Sobre a Morfologia e o Ciclo Evolutivo Do Schizotrypanum Cruzi n. Gen., n. Sp., Ajente Etiolojico de Nova Entidade Morbida Do Homem. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz 1(2), 1909. p.159–218.

CHANDRASEKAR, B., et al. Differential Regulation of Nitric Oxide Synthase Isoforms in Experimental Acute Chagasic Cardiomyopathy. Clinical and Experimental Immunology 121(1), 2000. p.112–19.

CHAPADEIRO, E, et al. Lesões Cardíacas Em Ratos Wistar Inoculados Com Diferentes Cepas Do Trypanosoma Cruzi. Revista da sociedade Brasileira de medicina tropical 21(3), 1988. p.95–103.

CORTEZ, Cristian, et al. Differential Infectivity by the Oral Route of Trypanosoma Cruzi Lineages Derived from Y Strain. PLoS Neglected Tropical Diseases 6(10), 2012. Doi: 10.1371/journal.pntd.0001804.

\_\_\_\_\_, et al. Structural Basis of the Interaction of a Trypanosoma Cruzi Surface Molecule Implicated in Oral Infection with Host Cells and Gastric Mucin. PLoS ONE 7(7), 2012. Doi: 10.1371/journal.pone.0042153.

COURA, José Rodrigues. The Main Sceneries of Chagas Disease Transmission. The Vectors, Blood and Oral Transmissions - A Comprehensive Review. [En línea]. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz 110(3), 2015. p.277–82. Disponible en: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0074-02762014005040362&lng=en&nrm=iso&tlng=en](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0074-02762014005040362&lng=en&nrm=iso&tlng=en).

\_\_\_\_\_ y BORGES-PEREIRA, José. Review Article / Artigo de Revisão Chagas Disease . What Is Known and What Should Be Improved : A Systemic Review Doença de Chagas. O Que é Conhecido e o Que Deve Ser Melhorado : Uma Visão

Sistêmica. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical 45(3), 2012. p.286–96.

COURA, José Rodrigues y JUNQUEIRA, Angela C.V. Risks of Endemicity, Morbidity and Perspectives Regarding the Control of Chagas Disease in the Amazon Region. Memorias do Instituto Oswaldo Cruz 107(2), 2012. p.145–54.

DE SUÁREZ, Claudia y MERINO NIÑO, Fernando. Transmisión Oral de La Enfermedad de Chagas: Con Especial Referencia a La Patología de Los Casos Del Año 2009. Gaceta Medica de Caracas 118(3), 2010. p.189–202.

DESQUESNES, Marc y DE LANA, Marta. American Trypanosomiasis Veterinary Aspects and Experimental Studies. First Edit. Elsevier Inc., 2010. Doi: 10.1016/B978-0-12-384876-5.00012-5.

DIAS DA SILVA, Valdo José, et al. Análise Da Função Autonômica Cardíaca Em Hamsters Chagásicos. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical 36 Suppl 2(Suplemento II), 2003. p.11–12.

DIAS, Juarez Pereira, et al. Acute Chagas Disease Outbreak Associated with Oral Transmission. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical 41(3), 2008. p.296–300. Doi: 10.1590/S0037-86822008000300014.

DÍAZ, Martha L. y GONZÁLEZ, Clara Isabel. Enfermedad de Chagas Agudo: Transmisión Oral de Trypanosoma Cruzi Como Una Vía de Transmisión Re-Emergente. Revista de la Universidad Industrial de Santander 46(2), 2014. p.177–88.

\_\_\_\_\_, et al. Acute Chagas Outbreaks: Molecular and Biological Features of Trypanosoma Cruzi Isolates, and Clinical Aspects of Acute Cases in Santander,

Colombia. *Parasites and Vectors* 8(1), 2015. p.1–14. Doi: 10.1186/s13071-015-1218-2.

DOS REIS, Daniele, et al. Biological Behaviour in Mice of *Trypanosoma Cruzi* Isolates from Amazonas and Paraná, Brazil. *Experimental Parasitology* 130(4), 2012. p.321–29. Doi: 10.1016/j.exppara.2012.02.016.

DUARTE, Luisa Fernanda, et al. Comparison of Seven Diagnostic Tests to Detect *Trypanosoma Cruzi* Infection in Patients in Chronic Phase of Chagas Disease. [En línea]. *Colombia médica* (Cali, Colombia) 45(2), 2014. p.61–66. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25100890> <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC4123583>.

DURÁN, Pamela; SIÑANI, Edda y DEPICKÈRE, Stéphanie. Biological Cycle and Preliminary Data on Vectorial Competence of *Triatoma Boliviana* in Laboratory Conditions. *Acta Tropica* 140, 2014. p.124–29. Doi: 10.1016/j.actatropica.2014.08.014.

FABRINO, Daniela L., et al. Rat Models to Investigate Host Macrophage Defense against *Trypanosoma Cruzi*. *Journal of Innate Immunity* 3(1), 2011. p.71–82. Doi: 10.1159/000320641.

\_\_\_\_\_, et al. Histological Approaches to Study Tissue Parasitism During the Experimental *Trypanosoma Cruzi* Infection. *Light Microscopy, Methods in Molecular Biology* 689, 2011. p.69–80. Doi: 10.1007/978-1-60761-950-5.

FLÓREZ, Oscar, et al. Chagasic Megacolon Associated with *Trypanosoma Cruzi* in a Colombian Patient. *Parasitology Research* 107(2), 2010. p.439–42. Doi: 10.1007/s00436-010-1874-2.

GASCON, Joaquim; BERN, Caryn y PINAZO, María Jesús. Chagas Disease in Spain, the United States and Other Non-Endemic Countries. *Acta Tropica* 115(1–2), 2010. p.22–27. Doi: 10.1016/j.actatropica.2009.07.019.

GIBSON-CORLEY, Katherine; OLIVIER, Alicia K. y MEYERHOLZ, David K. Principles for Valid Histopathologic Scoring in Research. *Veterinary Pathology* 50(6), 2013. p.1007–15.

GOMES, Yara M.; LORENA, Virginia y LUQUETTI, Alejandro O. Diagnosis of Chagas Disease: What Has Been Achieved? What Remains to Be Done with Regard to Diagnosis and Follow up Studies? *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 104(SUPPL. 1), 2009. p.115–21.

GRAEFE, Sebastian E.B., et al. Murine Susceptibility to Chagas' Disease Maps to Chromosomes 5 and 17. *Genes and immunity* 4(5), 2003. p.321–25.

GUHL, Felipe, et al. Actualización de La Distribución Geográfica y Ecoepidemiología de La Fauna de Triatominos ( Reduviidae : Triatominae ) En Colombia. *Biomédica* 27, 2007. p.143–62.

\_\_\_\_\_ y LAZDINS-HELDS, Janis K. Reporte Sobre La Enfermedad de Chagas. Grupo de trabajo científico.: Geneva: World Health organization: 104, 2007.

HERNÁNDEZ, Libia Milena, et al. Brote de Chagas Agudo En Lebrija , Santander 2008. *Artículo Institucional* 4, 2008. p.28–36.

INSTITUTE FOR LABORATORY ANIMAL RESEARCH. 46 Guide for the Care and Use of Laboratory Animals Guide for the Care and Use of Laboratory Animals: Eighth Edition. National R. ed. The National Academies Press. Washington, DC: The National Academies Pres, 2011.

KROPF, Simone Petraglia. Carlos Chagas e Os Debates e Controvérsias Sobre a Doença Do Brasil (1909-1923). *História, Ciências, Saúde – Manguinhos* 16(1), 2009. p.205–27. Doi: 10.1590/S0104-59702009000500010.

KUEHN, Christian C., et al. Distinctive Histopathology and Modulation of Cytokine Production during Oral and Intraperitoneal *Trypanosoma Cruzi* y Strain Infection. *Parasitology* 141(7), 2014. p.904–13. Doi: 10.1017/S0031182013002059.

LABRADOR HERNÁNDEZ, Marialeycnan, et al. The Cholinergic System in Cyclophosphamide Induced-Chagas Dilated Myocardiopathy in *Trypanosoma Cruzi* Infected Rats: An Electrocardiographic Study. *Invest Clin* 49(2), 2008. p.207–24.

LEÓN, Cielo M., et al. Retrospective Distribution of *Trypanosoma Cruzi* I Genotypes in Colombia. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 110(3), 2015. p.387–93. Doi: 10.1590/0074-02760140402.

LEÓN NUÑEZ, Leonardo José. SIVIGILA Informe Del Evento Enfermedad de Chagas, Hasta El Noveno Periodo Epidemiológico, Colombia, 2017.

LUEHRING FONTES MARTINS, Tassiane Assiria. Avaliação Da Terapia de Combinação Do Itraconazol e Benznidazol No Tratamento Da Doença de Chagas Experimental Avaliação Da Terapia de Combinação Do Itraconazol e Benznidazol No Tratamento Da Doença de Chagas Experimental. Universidade Federal de Ouro Preto, 2012.

MACHADO, Juliana Reis. Avaliação Da Resposta Imunológica e Das Lesões Cardíacas Em Camundongos Reinfectedos Com as Cepas Y e Colombiana de *Trypanosoma Cruzi* Avaliação Da Resposta Imunológica e Das Lesões Cardíacas Em Camundongos Reinfectedos Com as Cepas Y e Colombiana de Trypa, 2013.

MALAQUIAS DIAS, Greicy Brisa, et al. Evolution of Infection in Mice Inoculated by the Oral Route with Different Developmental Forms of *Trypanosoma Cruzi* I and II. *Experimental Parasitology* 135, 2013. p.511–17.

MANARIN, Romina, et al. Efficacy of Novel Benznidazole Solutions during the Experimental Infection with *Trypanosoma Cruzi*. *Parasitology International* 62(1), 2013. p.79–81. Doi: 10.1016/j.parint.2012.09.001.

MARTINS, Luciamare Perinetti Alves, et al. Incidence of *Trypanosoma Cruzi* Transmission through Breastfeeding during Acute Experimental Chagas Disease. *The Brazilian journal of infectious diseases: an official publication of the Brazilian Society of Infectious Diseases* 15(2), 2011. p.116–18. Doi: 10.1016/S1413-8670(11)70155-6.

MELO, Rossana C. y MACHADO, Conceição. *Trypanosoma Cruzi*: Peripheral Blood Monocytes and Heart Macrophages in the Resistance to Acute Experimental Infection in Rats. *Experimental parasitology* 97(1), 2001. p.15–23. Doi: 10.1006/expr.2000.4576

MOGOLLÓN, Nora, et al. Resistencia de Las Crías de Ratas Wistar Chagásicas a Las Re infecciones Por *Trypanosoma Cruzi* The Resistance of Chagasic Wistar Rat Offspring to Reinfections by *Trypanosoma Cruzi*. 40(2), 2012. p.172–85.

MONCAYO, Álvaro. Carlos Chagas: Biographical Sketch. *Acta Tropica* 115(1–2), 2010. p.1–4.

MONTEÓN, Víctor, et al. Caracterización Biológica de Aislados Mexicanos de *Trypanosoma Cruzi*: Metaciclo génesis , Parasitemia y Resistencia Contra Benznidazol. *Rev Biomed* 20(3), 2009. p.206–14.

MORENO, Elio, et al. Efecto de Inóculos Bajos En La Infección Experimental Por Trypanosoma Cruzi. [En línea]. Malariol. San. Amb 39, 1999. p.1–9. Disponible en: [http://webdelprofesor.ula.ve/economia/borgesr/Elio Moreno 99.pdf](http://webdelprofesor.ula.ve/economia/borgesr/Elio%20Moreno%2099.pdf).

\_\_\_\_\_, et al. Caracterización Biológica e Isoenzimática de Aislados de Trypanosoma Cruzi. XLII, 2002. p.17–28.

\_\_\_\_\_, et al. Effects of Acute Chagasic Infection on Gestating Wistar Rats. Revista Científica 16(5), 2006. p.506–16.

\_\_\_\_\_, et al. Investigaciones Sobre La Transmisión Vertical de Trypanosoma Cruzi en Ratas Wistar Crónicamente Infeccionadas. Boletín de Malariología y Salud Ambiental XLVI(2), 2006. p.149–60.

MORRISON, W.I, et al. Susceptibility of Inbred Strains of Mice to Trypanosoma Congolense: Correlation with Changes in Spleen Lymphocyte Populations. Clinical and experimental immunology 32(1), 1978. p.25–40.

NOYA, Belkisyolé Alarcón de, et al. Update on Oral Chagas Disease Outbreaks in Venezuela: Epidemiological, Clinical and Diagnostic Approaches. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz 110(3), 2015. p.377–86. Doi: 10.1590/0074-02760140285.

OLIVIERA, Kleber Mirallia de, et al. Alterações Teciduais Agudas Induzidas Em Ratos Wistar Por Trypanosoma Cruzi. Revista Electronica de farmácia IV(1), 2007. p.86–94.

OLMO, Francisco, et al. Prospects of an Alternative Treatment against Trypanosoma Cruzi Based on Abietic Acid Derivatives Show Promising Results in Balb/c Mouse Model. European Journal of Medicinal Chemistry 89, 2015. p.683–90. Doi: 10.1016/j.ejmech.2014.11.004.

ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD. La Enfermedad de Chagas (Tripanosomiasis Americana), 2018.

PAHO WHO - Pan American Health Organization y World Health Organization. General Information - Chagas Disease, 2016.

PARADA, Henry y CARRASCO, Hugo A. Cardiac Involvement Is a Constant Finding in Acute Chagas ' Disease : A Clinical , Parasitological and Histopathological Study. International Journal of Cardiology 60(December 1996), 1997. p.49–54.

PÉREZ-MOLINA, José A. y MOLINA, Israel. Chagas Disease. The Lancet 391(10115), 2018. p.82–94.

POSTAN, Miriam; ARNAIZ, Maria Rosa y FICHERA, Laura E. Respuesta de Las Celulas Musculares Cardiacas a La Infeccion Con Trypanosoma Cruzi. Medicina 59(SUPPL. 2), 1999. p.57–62.

RAMÍREZ, Juan David, et al. Molecular Epidemiology of Human Oral Chagas Disease Outbreaks in Colombia. PLoS Neglected Tropical Diseases 7(2), 2013. p.1–7. Doi: 10.1371/journal.pntd.0002041.

RASSI, Anis; RASSI, Anis y MARIN-NETO, José Antonio. Chagas Disease. The Lancet 375(9723), 2010. p.1388–1402. Doi: 10.1016/S0140-6736(10)60061-X.

REGUEIRO, Ander, et al. Myocardial Involvement in Chagas Disease: Insights from Cardiac Magnetic Resonance. International Journal of Cardiology 165(1), 2013. p.107–12. Doi: 10.1016/j.ijcard.2011.07.089.

RÍOS, Juan Fernando, et al. Probable Brote de Transmisión Oral de Enfermedad de Chagas En Turbo, Antioquia. Biomédica: revista del Instituto Nacional de Salud 31,

2011. p.185–95.

RODRÍGUEZ-FÉLIX, María E., et al. Riesgo de Transmision de La Enfermedad de Chagas Por Donantes de Sangre. *Rev Biomed* 6(490), 1995. p.70–75.

RODRIGUEZ, Hector O., et al. Trypanosoma Cruzi Strains Cause Different Myocarditis Patterns in Infected Mice. *Acta Tropica* 139, 2014. p.57–66. Doi: 10.1016/j.actatropica.2014.07.005.

RUEDA, Karina, et al. Transmisión Oral de Trypanosoma Cruzi: Una Nueva Situación Epidemiológica de La Enfermedad de Chagas En Colombia y Otros Países Suramericanos, 2014. p.631–41.

SANTANA, Camilla Alves. UnB Influência Da via de Transmissão Do Trypanosoma Cruzi Na Carga Parasitária e Produção de Anticorpos Específicos. Universidade de Brasília – UnB, 2015.

SCHMUNIS, Gabriel A. Epidemiology of Chagas Disease in Non-Endemic Countries: The Role of International Migration. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 102(SUPPL. 1), 2007. p.75–85. Doi: 10.1590/S0074-02762007005000093.

SHIKANAI-YASUDA, Maria Aparecida, et al. Possible Oral Transmission of Acute Chagas' Disease in Brazil. *Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo* 33(5), 1991. p.351–57. Doi: 10.1590/S0036-46651991000500003.

SHIKANAI-YASUDA, Maria Aparecida y BARBOSA CARVALHO, Noemia. Oral Transmission of Chagas Disease. *Clinical Infectious Diseases* 54(6), 2012. p.845–52. Doi: 10.1093/cid/cir956.

SOTO, Hugo, et al. Investigación de Vectores y Reservorios En Brote de Chagas Agudo Por Posible Transmisión Oral En Aguachica, Cesar, Colombia. *Cadernos de Saúde Pública* 30(4), 2014. p.746–56. Doi: 10.1590/0102-311X00024013.

STEVERDING, Dietmar. The History of Chagas Disease. *Parasites and Vectors* 7(1), 2014. p.1–8.

SUÁREZ, Nicolas, et al. Characteristic Biological of a Strain of *Trypanosoma Cruzi*. *Acta Tropica* 26(2), 2009. p.10–12.

TEIXEIRA, Antonio; NASCIMENTO, Rubens J. y STURM, Nancy R. Evolution and Pathology in Chagas Disease - A Review. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 101(5), 2006. p.463–91.

TRIANA, Omar y SUÁREZ, Diana Carolina. Investigación de Vectores y Reservorios En Brote de Chagas Agudo Por Posible Transmisión Oral En Aguachica , Cesar, Colombia Investigation of Vectors and Reservoirs in an Acute Chagas Outbreak Due to Possible Oral Transmission in Aguachica , Cesar , Colo. 30(4), 2014. p.746–56. Doi: 10.1590/0102-311X00024013.

TYLER, Kevin M. y ENGMAN, David N. The Life Cycle of *Trypanosoma Cruzi*. *International Journal for Parasitology* 31(5–6), 2001. p.472–81.

VELÁZQUEZ, Elsa B., et al. Predictive Role of Polymerase Chain Reaction in the Early Diagnosis of Congenital *Trypanosoma Cruzi* Infection. *Acta Tropica* 137, 2014. p.195–200. Doi: 10.1016/j.actatropica.2014.05.016.

VIANNA MARTINS, André, et al. Biology of *Trypanosoma Cruzi*: An Update. *Infectio* 16(1), 2012. p.45–58. Doi: 10.1016/S0123-9392(12)70057-7.

WESTPHALEN, Elizabeth V.N.Araújo; BISUGO, Márcia Conceição y LERENO ARAÚJO, Maria de Fátima. Aspectos Epidemiológicos e Históricos Do Controle Da Doença de Chagas No Continente Americano. Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo 9(105), 2012. p.17–34.

WHO. Control and Prevention of Chagas Disease in Europe. World Health Organization (December), 2009. p.69.

\_\_\_\_\_. Chagas Disease (American Trypanosomiasis). Geneva, Switzerland, 2015.

ZINGALES, Bianca. Trypanosoma Cruzi: Um Parasita, Dois Parasitas Ou Vários Parasitas Da Doença de Chagas? Revista da Biologia 6b, 2011. p.44–48.

———.The Revised Trypanosoma Cruzi Subspecific Nomenclature: Rationale, Epidemiological Relevance and Research Applications. Infection, Genetics and Evolution 12(2), 2012. p.240–53. Doi: 10.1016/j.meegid.2011.12.009.