

Universidad Nacional de Córdoba



**Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales.
Carrera de Ciencias Biológicas.**

Determinación de los linajes presentes en distintos aislamientos de *Trypanosoma cruzi* y su distribución en sangre, corazón y músculo esquelético del huésped durante la etapa aguda de la infección experimental.

Diego Miguel Moya
Tesisista

Dra. María Silvina Lo Presti
Directora

**Cátedra de Física Biomédica. Facultad de Ciencias Médicas. Universidad
Nacional de Córdoba. Argentina.**

2016

Determinación de los linajes presentes en distintos aislamientos de *Trypanosoma cruzi* y su distribución en sangre, corazón y músculo esquelético del huésped durante la etapa aguda de la infección experimental.

Tribunal Examinador

Dra. Claudia Rodríguez

Firma:

Dra. Ma. Alejandra Bertolotti

Firma:

Dr. Raúl González Ittig

Firma:

Calificación:

Fecha:

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a muchas personas por acompañarme durante los años de cursado y han colaborado con mi trabajo de Tesina directa e indirectamente.

Muchas gracias a mi directora, Dra. Maria Silvina Lo Presti, por dejarme ser parte de este hermoso proyecto de investigación, por acompañarme, guiarme y brindarme su apoyo en todo momento.

Un especial agradecimiento a la directora de la cátedra Física Biomédica, Dra. Patricia Paglini y al Dr. Walter Rivarola, por permitirme formar parte de este magnífico grupo de personas, de los cuales me llevo muy gratos recuerdos y lindas experiencias.

A mis compañeras de laboratorio Dra. Carolina Bazán, Dra. Alejandra Báez, Biól. Mariana Strauss y Biól. Blanca Esteves que participaron en esta Tesina, aportando muestras, ideas y resultados de sus respectivas investigaciones, gracias sobre todo por ser excelentes personas y brindarme su amistad.

A las Dras. Vilma Campana, Mónica Moya y Noemi Miler, por su compañía y apoyo.

A todos mis compañeros de la Facultad de Ciencias Exactas Físicas y Naturales, en especial a Daniel y Giuliano, por tantos trabajos y lindos momentos que pasamos.

A mis amigos por su ayuda incondicional en todos los aspectos de mi vida.

Un especial agradecimiento a mi familia: A mis padres, Alberto y Silvia, por darme su ejemplo, su amor incondicional, su tiempo, su esfuerzo y aliento en todos los momentos de mi vida, gracias Pa y Ma!! A mis abuelos, Miguel (donde estes nono se que siempre estaras conmigo) y Teresa, por estar siempre presentes, por darnos todo su cariño, su comprensión y apoyo. A mis dos hermanos, Javier y Nicolas, que además de hermanos son mis amigos, gracias por estar siempre. A mi sobrino, Alejo, gracias por su cariño y su compañía. A mi tía, Sonia y primas Romina, Julieta y Gianina. A mis suegros, Rene y Amelia y cuñados por brindarme su apoyo y dejarme formar parte de su hermosa familia.

Y quiero agradecer especialmente a una persona muy importantes en mi vida, Romina Manattini, gracias amor por darme tu cariño incondicional por acompañarme cada instante de mi vida, por ser mi compañera, mi amiga, mi pareja y madre de mi hijo, ¡Te amo mucho!.

Con todo mi amor se lo dedico a mi hijo Agustin Moya

“No estalla como las bombas ni suena como los tiros. Como el hambre, mata callando. Como el hambre, mata a los callados: los que viven condenados al silencio y mueren condenados al olvido. Tragedia que no suena, enfermos que no pagan, enfermedad que no vende. El mal de Chagas no es negocio que atraiga a la industria farmacéutica, ni es tema que interese a los políticos ni a los periodistas. Elige a sus víctimas en el pabrerío. Las muerde y lentamente, poquito a poco, va acabando con ellas. Sus víctimas no tienen derechos, ni dinero para comprar los derechos que no tienen. Ni siquiera tienen el derecho de saber de qué mueren”.

- Chagas, una tragedia silenciosa - Eduardo Galeano

ÍNDICE

<u>Contenido</u>	<u>Página</u>
I. Resumen.....	6
II. Introducción.	
• Enfermedad de Chagas.....	8
• Agente Etiológico	9
• Vías de transmisión.....	18
• Fases de la enfermedad.....	20
• Manifestaciones clínicas.....	22
• El tratamiento en distintos escenarios clínicos.....	23
• Objetivos.....	25
III. Materiales y métodos.....	26
IV. Resultados.	
• Parasitemia.....	32
• Sobrevida.....	37
• Estudios Histológicos.....	39
• Detección y tipificación de <i>T. cruzi</i>	50
• RFLP.....	53
V. Discusión.....	57
VI. Conclusiones.....	68
VII. Bibliografía.....	69

RESUMEN

Diversos estudios han demostrado alta incidencia de infecciones mixtas (con varias cepas o aislamientos de *Trypanosoma cruzi* en un mismo individuo) en humanos, reservorios y vectores, parámetro que podría influir en la evolución de la enfermedad de Chagas. Así, la amplia gama de signos clínicos que caracterizan a esta enfermedad puede explicarse en parte por la heterogeneidad genética del parásito y por la distribución de estos diferentes clones en un mismo individuo. Una de las diferencias que presentan las distintas cepas del parásito es un marcado tropismo tisular diferencial en los órganos del huésped que puede variar en los distintos momentos de la infección. En el presente trabajo se determinó la presencia y distribución de una cepa (Tulahuen) y tres aislamientos naturales de *T. cruzi* (SGO Z12, Lucky y Casibla) en sangre, corazón y músculo esquelético, durante la etapa aguda de la infección experimental (35 días post infección).

Se infectaron ratones albino suizos (n=100) con 50 parásitos de cada cepa/aislamiento o con una combinación de dos de ellos. Su presencia en los diferentes tejidos (sangre, corazón y músculo esquelético) se determinó por PCR específica para *T. cruzi*. Su distribución diferencial se analizó determinando el linaje del parásito presente en cada muestra (mediante tipificación molecular de los mismos) y las diferentes subpoblaciones se detectaron por el polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP) utilizando la enzima Bce AI. Las alteraciones en corazón y músculo esquelético se analizaron mediante estudios histológicos.

El parásito se encontró presente en todas las muestras analizadas (PCRs positivas). El análisis histológico mostró la presencia de infiltrados inflamatorios más severos en músculo esquelético que en corazón en todas las muestras, además se observó la presencia de nidos de amastigotes en la mayoría de las muestras de músculo esquelético.

La cepa Tulahuen demostró estar formada por parásitos correspondientes al linaje TcV; los tres aislamientos naturales por su parte mostraron estar compuestos por una mezcla de TcII y TcVI. En los ratones infectados con la cepa Tulahuen, todas las muestras presentaron el linaje TcV; esta homogeneidad fue confirmada por el RFLP. En los ratones infectados con el aislamiento SGO Z12, en circulación y en las muestras de corazón se encontraron los linajes TcII y TcVI, mientras que en las muestras de músculo esquelético sólo se encontró el linaje TcVI. La presencia de un tipo de parásito diferente en estas muestras de músculo esquelético fue corroborada por los patrones de restricción (RFLP). La mayoría de las muestras correspondientes a los ratones infectados con los aislamientos Lucky y Casibla presentaron los linajes TcII y TcVI.

Las muestras de sangre, corazón y músculo esquelético de los ratones infectados con una mezcla de la cepa Tulahuen y el aislamiento SGO Z12, presentaron solo el linaje TcVI. TcII y TcV no se encontraron presentes en ningún caso en las muestras de este grupo. En los grupos que fueron infectados con el resto de las combinaciones de cepas/aislamientos, se observó la presencia de los linajes TcII y TcVI en la mayoría de los casos. Los grupos infectados con

solo una cepa/aislamiento presentaron mayor variabilidad en la distribución de los parásitos que aquellos grupos infectados con combinaciones de ellos.

Los presentes resultados demuestran la distribución de los parásitos en los tejidos del huésped desde etapas tempranas de la infección: la presencia de parásitos en corazón confirma el cardiotropismo de *T. cruzi* y su presencia en los cortes de músculo esquelético evidencia la importancia de este órgano como reservorio de parásitos. Los aislamientos naturales utilizados están formados por una mezcla de los linajes TcII y TcVI que corresponden a dos de los linajes de *T. cruzi* más frecuentemente asociados al ciclo domiciliario de infección en nuestro país. TcV no fue encontrado en ninguna de las muestras provenientes de los grupos coinfectados, sugiriendo que este linaje sería más susceptible a la respuesta inmunológica del huésped. Cada linaje puede mostrar tropismo diferencial por los tejidos del huésped, lo que resalta la importancia de los presentes resultados para aquellos pacientes de área endémica que pueden tener infecciones mixtas. El tropismo de las subpoblaciones de parásitos sin embargo, estaría influenciado por la presencia de una mayor cantidad de subpoblaciones o por interacciones entre parásitos de diferentes linajes. La presencia de un linaje determinado dependerá del “repertorio” de parásitos infectantes en cada caso.

Estos resultados pretenden contribuir al entendimiento de las variabilidades clínicas y facilitar el establecimiento de un pronóstico y posterior elección del tratamiento de la enfermedad de Chagas, teniendo en cuenta la variabilidad genética del parásito y la presencia de subpoblaciones en los diferentes tejidos del huésped.

Palabras Clave

Linajes de *Trypanosoma cruzi*, PCR, tipificación molecular, histotropismo, etapa aguda de la enfermedad de Chagas.

INTRODUCCIÓN

Enfermedad de Chagas

La enfermedad de Chagas es una afección parasitaria hística y hemática producida por el protozooario flagelado *Trypanosoma cruzi*, que afecta diversos mamíferos, entre ellos el hombre (Storino y Milei, 1994).

El mecanismo más frecuente de transmisión de esta infección es a través de insectos vectores pertenecientes a diversas especies de la Familia Reduviidae, Subfamilia Triatominae, siendo el más importante en nuestro país *Triatoma infestans* (OMS, 2007).

El hombre también puede adquirir la infección a través de transfusiones de sangre y trasplantes de órganos, por vía digestiva al ingerir alimentos contaminados, por vía congénita, o por accidentes de laboratorio y manipulación de animales infectados (Martins y col., 2011).

El mal de Chagas es considerado por la OMS como una de las 13 enfermedades tropicales más desatendidas del mundo. Sin embargo, se trata de una afección mortal y es, además, una de las principales causas que impide el desarrollo económico de amplias zonas rurales en Latinoamérica, sobre todo en zonas marginadas y de pobreza. Afecta entre 10 y 18 millones de personas en América y actualmente se está convirtiendo en un problema sanitario también en países no endémicos, debido a los movimientos migratorios (Schmunis y Yadon, 2010).

En la Argentina, el número de infectados con *T. cruzi* es el 4 % de la población (Ministerio de Salud, 2012). Información reunida hasta 2010, ubica a la Argentina en el primer puesto de América en la lista de infectados con mal de Chagas. El estudio sostiene que hay 1.505.235 pacientes chagásicos y el área endémica que cubre alrededor del 70 % de la superficie del país, comprende desde el límite norte con Bolivia, Paraguay y Brasil, hasta la provincia de Chubut (Wisnivesky-Colli y col., 2003). En la lista de la OMS siguen Brasil y México (OMS, 2006).

Si bien los mecanismos de control vectorial han reducido considerablemente la transmisión de esta infección, la situación socioeconómica de nuestro país en los últimos años, ha generado un incremento de los infectados aún no cuantificado en su real magnitud (Kierszenbaum, 2005).

La enfermedad fue nombrada en reconocimiento al médico e infectólogo brasileño, Carlos Chagas, quien en 1909 la describió por primera vez en el pueblo de Lassance, estado de Minas Gerais, Brasil. El trabajo de Chagas fue especial en la historia de la medicina, por ser el único investigador que pudo describir por completo una enfermedad infecciosa, es decir, el

Introducción

patógeno, su vector y hospedador, las manifestaciones clínicas y la epidemiología. Cabe mencionar que la enfermedad de Chagas ha sido la única en la que primero se ha descrito el agente etiológico y el transmisor y posteriormente se describió la entidad nosológica. (De Haro Arteaga, 2003).

Agente Etiológico

Clasificación taxonómica

En función del comportamiento del parásito, principalmente en el vector, el género *trypanosoma* se ha dividido en dos grupos. El primero, llamado Stercoraria, incluye los Tripanosomas que se desarrollan en el tubo digestivo del vector, progresando en el sentido de la porción intestinal con liberación de las formas infectivas con las heces. En este grupo tenemos a *T. cruzi* (Tabla 1) y *T. lewisi*. El segundo grupo, llamado Salivaria, incluye tripanosomas que se desarrollan inicialmente en el tubo digestivo y posteriormente atraviesan el epitelio digestivo y llegan a las glándulas salivales, donde las formas infectivas son inoculadas mecánicamente. En este grupo se encuentran: *T. brucei*, *T. congolense* y *T. rangeli*.

Tabla 1: Clasificación taxonómica de *Trypanosoma cruzi* (Gallego Berenguer, 1998)

Clasificación Taxonómica	
Subreino	Protozoa
Phylum	Sarcomastigophora
Subphylum	Mastigophora
Clase	Zoomastigophorea
Orden	Kinetoplastida
Familia	Trypanosomatidae
Género	<i>Trypanosoma</i>
Subgénero	<i>Schizotrypanum</i>
Sección	Stercoraria
Especie	<i>Trypanosoma cruzi</i>

Introducción

Origen evolutivo

Se ha postulado que *T. cruzi* posee un origen monofilético, a partir de una forma parásita ancestral que dio origen a los tripanosomas de mamíferos de África, América y Australia, como también a otras varias formas parásitas de peces. Esta hipótesis es apoyada por el análisis filogenético de los genes ribosomales 18S. Posiblemente, el surgimiento de la rama *cruzi* ocurrió antes de la separación del supercontinente (Gondwana) en la era Cenozoica y evoluciono en los ancestros de los marsupiales, aproximadamente, 40 millones de años atrás. En ese período, los ancestros de los didélfidos americanos modernos (comadreja) comenzaron su dispersión y los ancestros de *T. cruzi* pasaron a ser transmitidos directamente entre los marsupiales a través de las secreciones de las glándulas anales y/o urinarias. Basados en esa hipótesis, se sugiere una primitiva asociación de este parásito con los marsupiales del género *Didelphis* (Yeo y col., 2005).

Se ha propuesto que inicialmente la transmisión del parásito ocurría entre mamíferos silvestres y vectores. Los primeros humanos que habitaron el continente pudieron incorporarse a dicho ciclo cuando desplazaron a los mamíferos locales de las cavernas infestadas de triatominos y las ocuparon con fines religiosos o para pintar en ellas. Así mismo, la domesticación de algunos mamíferos pudo favorecer que los vectores infectados se establecieran en el peridomicilio y más tarde se domesticaran (Martínez y Espinoza, 2012).

Morfología

Los Kinetoplástidos son flagelados con 1 o 2 flagelos que se originan de una abertura conocida como bolsa flagelar; normalmente contienen una estructura prominente y paraflagelar conocida como kinetoplasto, que corresponde a una condensación de ADN extranuclear localizada en el interior de una única mitocondria. El ADN del kinetoplasto (kDNA) representa alrededor del 30 % del ADN total del parásito. Otras estructuras características de estos organismos son organelas especializadas, tipo peroxisomas, conocidas como glicosomas y la presencia de microtúbulos subpeliculares. Dentro de la familia Trypanosomatidae, el género *Trypanosoma* es uno de los más importantes por incluir una serie de especies que ocasionan enfermedades en humanos, como *T. cruzi*, agente causal de la enfermedad de Chagas, *T. gambiensi* y *T. rhodesiense*, agentes causales de la enfermedad del sueño, y en animales, como es el caso de *T. brucei*, *T. equiperdum* y *T. equinum*.

Introducción

Ciclo de vida

Como parte de un proceso evolutivo y en función de la gran diversidad de ambientes que constituyen el nicho del parásito a lo largo de su ciclo de vida, se han seleccionado adaptaciones que le permiten persistir en condiciones tan variables como el tubo digestivo del insecto vector, la sangre de los mamíferos o el medio intracelular en estos huéspedes. Las adaptaciones a cada uno de los ambientes son acompañadas por cambios morfológicos, bioquímicos y fisiológicos en el parásito (Katzin y col., 1983; Isola y col., 1986). Todas estas modificaciones se traducen en estrategias adaptativas que evidencian su capacidad de establecerse y persistir en el huésped infectado (Nogueira y col., 1975; Joiner y col., 1985).

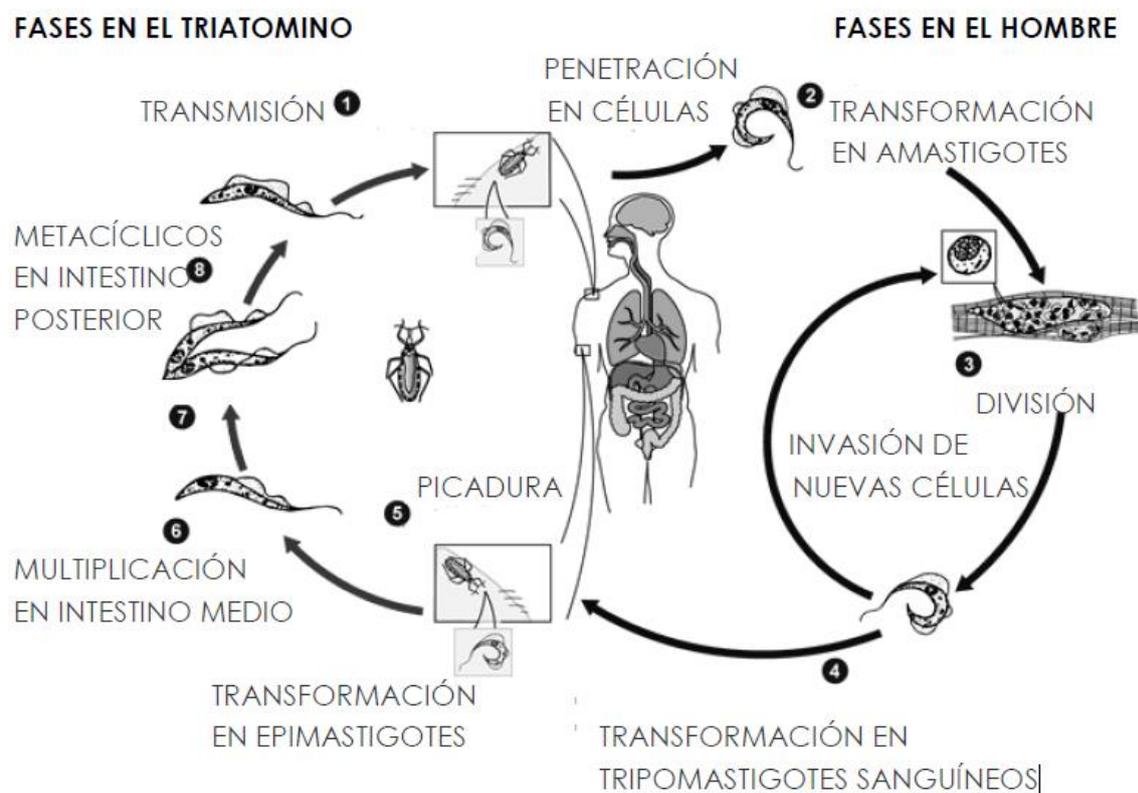


Figura 1: Detalle del ciclo biológico de *Trypanosoma cruzi* (CDC, 2005)

Su ciclo biológico (figura 1) se inicia cuando el insecto vector hematófago se alimenta de un mamífero infectado que puede contener tripomastigotes circulantes. En el intestino del vector inicialmente se diferencian a epimastigotes duplicativos, para luego pasar a tripomastigotes metacíclicos. Este proceso de diferenciación de un estadio replicativo no-infectivo a uno no-replicativo infectivo para el huésped mamífero es promovido por las condiciones del

Introducción

microambiente intestinal del vector (Isola y col. 1986, Fraidenaich y col. 1993, Wainszelbaum y col., 2003). Cuanto posteriormente el triatomino infectado se alimenta, defeca sobre la piel o mucosas del huésped mamífero depositando tripomastigotes metacíclicos. Éstos penetran en las células del tejido próximas al microtrauma de la picadura o de mucosas. Luego intracelularmente, el parásito se diferencia a amastigote, multiplicándose por fisión binaria. Después de numerosas duplicaciones, los amastigotes se diferencian a tripomastigotes, que son liberados por lisis celular, alcanzando el torrente circulatorio y pueden invadir nuevas células (Dvorak, 1975). Durante la diseminación hemática los tripomastigotes atraviesan los capilares sanguíneos alcanzando diversos tejidos. El ciclo biológico se completa cuando un insecto vector no parasitado se alimenta del mamífero infectado y adquiere el parásito.

La distribución geográfica de los insectos vectores y del huésped vertebrado, están asociadas a la preferencia de los insectos hematófagos por determinadas fuentes de alimento y definen dos ciclos de transmisión de *T. cruzi*: uno selvático, que involucra diferentes especies de insectos con animales salvajes, y otro doméstico o peridoméstico, en el cual tanto animales domésticos como seres humanos actúan como reservorios. La transmisión del parásito también puede realizarse sin la participación del insecto vector como ocurre en los casos de transmisión transfusional, congénita, trasplante de órganos y por alimentos contaminados.

Los estadios básicos (figura 2) se definen de acuerdo al hábitat y a caracteres morfológicos y estructurales como son la posición del kinetoplasto respecto del núcleo y la región donde se origina el flagelo (Katzin y col., 1983):

- **Epimastigote:** Estadio multiplicativo, no infectivo para el huésped mamífero, que se encuentra en el intestino medio del vector invertebrado. De aspecto fusiforme (20 a 40 μm de longitud), el kinetoplasto se localiza en posición anterior al núcleo y el flagelo se encuentra libre en casi toda su extensión.
- **Tripomastigote metacíclico:** Forma no multiplicativa e infectiva para el huésped mamífero, producto de la diferenciación de los epimastigotes en la porción distal del intestino del vector. Se deposita con las heces del insecto para luego penetrar por mucosas o por solución de continuidad de la piel en el huésped e infectar células (Fife, 1977). Tiene forma alargada (20 a 32 μm) y posee un núcleo vesiculoso con el kinetoplasto localizado posteriormente a éste. Debido a que el flagelo nace en la proximidad del kinetoplasto, emerge por un costado del soma del parásito y lo recorre

Introducción

por debajo de la membrana citoplasmática para liberarse por el extremo anterior, dando como resultado la ilusión óptica de una membrana ondulante extensa.

- **Tripomastigote sanguíneo:** Es la forma no multiplicativa e infectiva tanto para el como para el huésped. Surge de la diferenciación de los amastigotes. Puede infectar células nuevas o pasar al vector invertebrado y cerrar así el ciclo de vida del parásito. Tiene forma alargada y presenta el kinetoplasto posterior al núcleo. El flagelo se dispone de manera similar a la descrita para el tripomastigote metacíclico.
- **Amastigote:** Es el estadio multiplicativo e intracelular en el huésped mamífero. Proviene de la diferenciación de los tripomastigotes, tanto metacíclicos como sanguíneos. Posee una forma redondeada, mide 2 a 4 μm , su flagelo está encerrado dentro de una bolsa; presenta un núcleo grande y kinetoplasto.

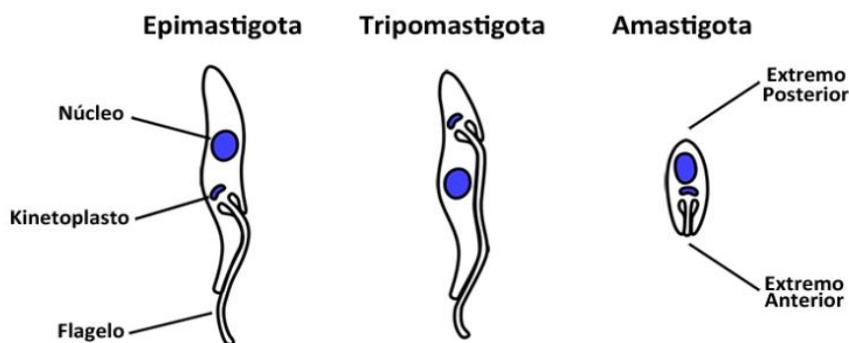


Figura 2: Estadios de *Trypanosoma cruzi*.

Estructura poblacional de T. cruzi

La especie *T. cruzi* muestra niveles muy altos de diversidad genética, y un gran número de marcadores genéticos han sido utilizados para estratificar a la especie en varias subdivisiones. Muchas evidencias apoyan la existencia de una estructura multiclonal de las poblaciones de *T. cruzi* (Tibayrenc y col., 1986; Tibayrenc y Ayala, 2002; Sturm y Campbell, 2010). El modelo propuesto no implica ausencia absoluta de recombinación genética, sino una frecuencia muy baja que no altera significativamente la propagación uniparental del parásito. Aún más, la recombinación ha sido observada mediante diversas estrategias, como isoenzimas (Bogliolo y col., 1996; Carrasco y col., 1996), RAPDs y estudios de cariotipo (Brisse y col., 2003), análisis de secuencias nucleotídicas (Machado y Ayala, 2001; Sturm y col., 2003) y microsatélites (de Freitas y col. 2006). En particular, Gaunt y colaboradores (2003) demostraron la capacidad de recombinación de *T. cruzi in vitro* mediante selección artificial

Introducción

de recombinantes resistentes a drogas. Estas experiencias mostraron ausencia de recombinación a nivel mitocondrial y la formación de un subtetraploide a nivel nuclear. Sin embargo, los híbridos observados naturalmente son diploides. No está claro, si los híbridos naturales y los experimentales se generaron por mecanismos distintos, o si los requisitos para volver a la diploidía se encuentran ausentes bajo condiciones experimentales (Gaunt y col., 2003).

Como consecuencia de esta particular estructura poblacional, que es mayoritariamente clonal con aislados eventos de recombinación, ha sido necesario generar consensos para la nomenclatura de *T. cruzi*. En 1999 se realizó la Primera reunión Satélite donde se decidió dividir a *T. cruzi* en dos linajes denominados TcI y TcII. Con el desarrollo de nuevos marcadores moleculares, más adelante se propuso dividir a *T. cruzi* en 6 Unidades Discretas de Tipificación (UDT: conjunto de parásitos que presentan mayor similitud genética entre cada uno de ellos que con miembros de otros grupos), donde se mantiene el linaje TcI original, pero el linaje TcII se subdivide en 5 UDT (TcIIa-e) (Tibayrenc, 2003). Estas unidades están comprendidas por cepas que son más parecidas entre ellas que con el resto de la población, y a su vez son identificables por marcadores genéticos, moleculares y/o inmunológicos. Sin embargo, teniendo en cuenta los estudios filogenéticos más recientes y con el objetivo de modificar la nomenclatura de *T. cruzi* de forma consensuada, se realizó la segunda reunión satélite, donde se modificó la denominación de los 6 UDT (*T. cruzi* I-VI) (Zingales y col., 2009) (Tabla 2 y figura 3).

Tabla 2. Nomenclatura actual de *T. cruzi* en relación a la nomenclatura anterior.

Tibayrenc y col. 2003	Tc I	Tc IIa	Tc IIb	Tc IIc	Tc II d	Tc II e
Nueva nomenclatura	Tc I	Tc II	Tc III	Tc IV	Tc V	Tc VI

TcI: Es el principal agente etiológico de la enfermedad de Chagas en los países al norte del Amazonas y en el Amazonas. Está fuertemente asociado con el ecotopo arbóreo.

Su principal vector en el Amazonas es *Rhodnius*, mientras que en América del Norte y Central es *Triatoma*. Su reservorio principal son las comadrejas (Coura y col., 2002; Roellig y col., 2008).

TcII: Es el principal causante de la enfermedad de Chagas en la región este y central de Brasil (Lages-Silva y col., 2006). Rara vez ha sido aislado del ciclo silvestre y se encuentra asociado

Introducción

al ciclo doméstico y peridoméstico. Su vector principal es *Pastronylus* (Sturm y Campbell, 2010).

TcIII: Al igual que TcIV es poco común encontrarlo en el ciclo doméstico, ya que está fuertemente asociado al ciclo silvestre terrestre. Sin embargo, en Santiago del Estero, ha sido aislado a partir de muestras de sangre periférica de perros (Cardinal y col., 2008). El principal reservorio es la mulita (*Dasypus novemcinctus*) y los vectores son de los géneros *Pastronylus* y *Triatoma*. Está asociado al ecotopo terrestre.

Geográficamente ha sido aislado desde el norte de América del Sur hasta Argentina (Sturm y Campbell, 2010).

TcIV: Es endémico en América del Norte junto a TcI, donde se encuentra asociado al ecotopo terrestre infectando fundamentalmente a mapaches, mientras que TcI infecta a las comadreas de las mismas zonas. También se encuentra presente en el Amazonas, aunque aparentemente estas poblaciones serían distintas a las de América del Norte (Roellig y col., 2008).

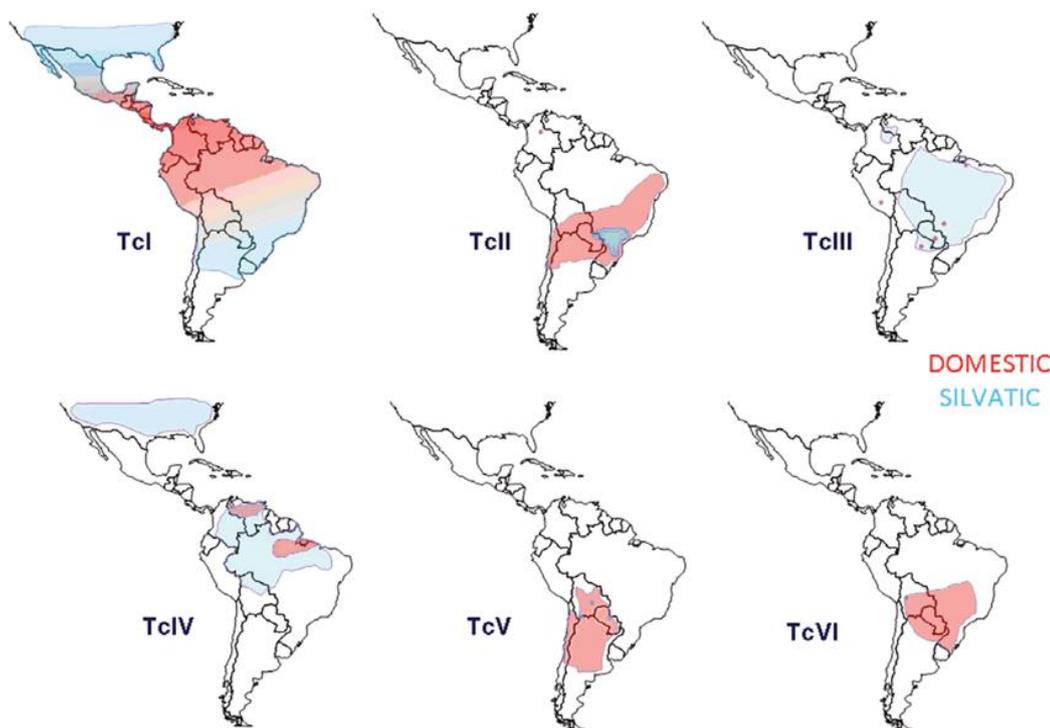


Figura 3: Distribución mundial de los seis UDTs de *Trypanosoma cruzi*.

TcV: Este UDT es el principal causante de la enfermedad de Chagas en la zona conocida como el Gran Chaco, que comprende partes de Argentina, Paraguay, Bolivia, Chile y el sur de Brasil. Se encuentra asociado casi exclusivamente al ciclo doméstico de la enfermedad y su

Introducción

principal vector es la vinchuca, *Triatoma infestans* (Diosque y col., 2003; del Puerto y col., 2010).

TcVI: Al igual que TcV, se encuentra asociado al ciclo doméstico y peridoméstico en el cono sur de América Latina. Particularmente, en Argentina se lo vio asociado a la infección de perros y gatos (Marcet y col., 2006; Cardinal y col., 2008).

Marcadores Moleculares

Dependiendo de los marcadores utilizados y la tecnología aplicada se han logrado ensayos con distintos grados de resolución para identificar los diferentes grupos del parásito. Estrategias de tipificación de polimorfismos genéticos en loci relativamente conservados son utilizadas para definir las principales subdivisiones genéticas (Souto y col., 1996; Fernandes y col., 1998), mientras que el análisis de loci altamente variables, tales como las secuencias de los minicírculos del ADN del kinetoplasto (ADNk) (Telleria y col., 2006; Burgos y col., 2007) o microsatélites (Oliveira y col., 1998; Llewellyn y col., 2009) permiten un mayor nivel de resolución. En particular, los microsatélites por ser secuencias que cuentan con solo dos alelos por genoma, permiten deducir la clonalidad de una población.

A los efectos de la epidemiología molecular, un desarrollo conceptual útil ha sido el de las UDT, que tienen valor taxonómico (Tibayrenc, 1998). Como se mencionó anteriormente, las seis UDT comprenden cepas agrupadas en base a características comunes de genotipos multilocus (Brisse y col., 2000; Brisse y col., 2001; Zingales y col., 2009) cada una con sus características epidemiológicas y evolutivas particulares.

Dos de las estrategias más utilizadas para la genotipificación de *T. cruzi*, son ensayos que tienen como blanco molecular a la secuencia del dominio D7 del gen 24S ARNr y a la región intergénica no transcripta del mini-exón (figura 4). Ambas permiten la discriminación de las diferentes UDT por simple visualización de las diferencias en el tamaño del producto amplificado mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Souto y col., 1996; Fernandes y col., 1998; Brisse y col., 2001; Mendonça y col., 2002).

En particular, el dominio D7 del gen 24S ARNr tiene trectos altamente conservados en todos los tripanosomátidos y se han diseñado oligonucleótidos complementarios a estas regiones (Briones y col., 1999; Souto y col., 1999). El fragmento amplificado por estos oligonucleótidos es polimórfico y su tamaño varía en algunas especies de tripanosomátidos y dentro de las diferentes UDT.

Por otro lado, el espaciador intergénico del mini-exón permite la separación de *T. cruzi* en 4 grandes grupos en concordancia con los eventos de hibridación que llevaron al origen de las

Introducción

6 UDT. El análisis de este marcador permite la discriminación de las UDT híbridas más antiguas, TcIII y TcIV, donde por evolución clonal prolongada en cada UDT se han fijado varios polimorfismos que permiten su identificación precisa. Las secuencias del espaciador intergénico del mini-exón de TcI también contienen polimorfismos originales que permiten su identificación (figura 4).

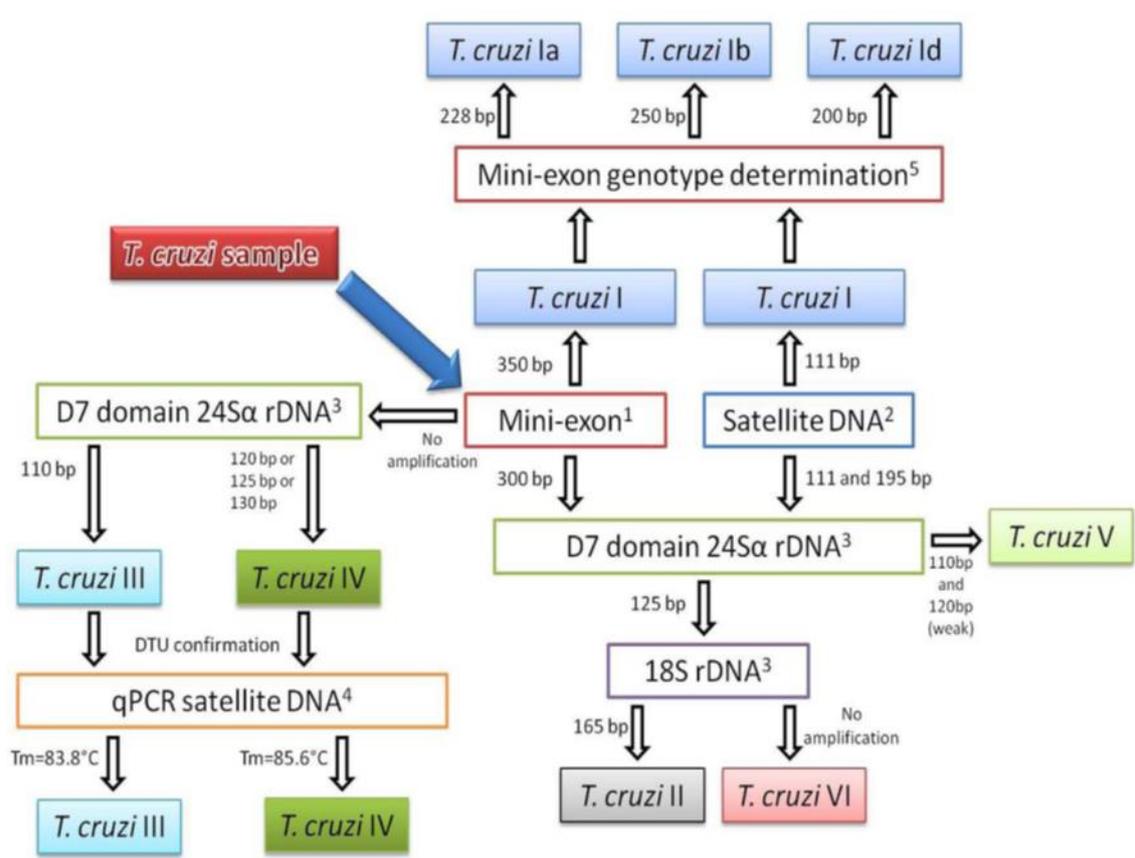


Figura 4: Algoritmo para la tipificación molecular de los seis UDTs de *Trypanosoma cruzi* basado en la utilización de cinco marcadores moleculares (Ramírez y col., 2010; basado en: 1. Souto y col., 1996, 2. Liarte y col., 2009, 3. Brisse y col., 2000, 4. Duffy y col., 2009 y 5. Falla y col., 2009).

Sin embargo, el o los eventos de hibridación que dieron lugar a las UDT TcV y TcVI ocurrieron, en términos evolutivos, hace relativamente poco y en ambos casos habría/n involucrado a las mismas UDT parentales (TcII y TcIII) (Westenberger y col., 2005; de Freitas y col., 2006). Como consecuencia de este proceso de hibridación, ambas UDT (TcV y TcVI), incorporaron de manera casi exclusiva secuencias del espaciador intergénico del

Introducción

mini-exón proveniente de la UDT parental TcII, haciendo imposible la discriminación entre estas tres UDT con este marcador molecular.

Vías de transmisión

Transmisión vectorial

La principal vía de transmisión de *T. cruzi* es la vectorial. Como se mencionó anteriormente, esta se produce cuando parásitos presentes en las heces del insecto penetran por la herida que causa la picadura, por lesiones en la piel o por las mucosas de ojos, boca o nariz. Los insectos capaces de infectarse y por lo tanto capaces de transmitir la enfermedad son de la subfamilia Triatominae, compuesta por más 130 especies, casi todas confinadas en las Américas. La mayoría de las especies americanas pertenecientes a esta subfamilia han sido reportadas infectadas por *T. cruzi*. Su hábitat natural incluye palmeras, huecos en los árboles, grietas en las piedras, pequeñas cuevas y otros refugios de animales donde pueden encontrar alimento. Los reservorios naturales del parásito son mamíferos de pequeño y mediano porte; han sido reportadas más de 100 especies de mamíferos infectadas por *T. cruzi*. Este ciclo de transmisión enzoótico entre vectores y reservorios silvestres se viene dando hace millones de años y es conocido como el ciclo silvestre de la enfermedad. Sin embargo, con la llegada del hombre a América hace aproximadamente 15.000 años, algunas especies de triatominos, como *T. infestans*, han logrado adaptarse a colonizar y prosperar en los domicilios y peridomicilios humanos donde transmiten el parásito a los hombres y animales domésticos (perros, gatos y cuises). Este ciclo de transmisión es conocido como el ciclo doméstico. Ambos ciclos no ocurren necesariamente aislados uno de otro, sino que según las características eco-epidemiológicas de cada lugar se pueden superponer. Esta superposición ocurre cuando el hombre incursiona en lugares donde la transmisión es fundamentalmente enzoótica, como por la invasión ocasional de vectores silvestres a los domicilios (Duffy, 2010).

Con el fin de disminuir la transmisión vectorial de la enfermedad de Chagas al hombre, se han realizado numerosos planes de desinfestación domiciliaria aplicando insecticidas. Durante la fase de vigilancia después de la desinfestación, se ha observado que otras especies de triatominos silvestres o peridomésticos han surgido como supuestos vectores secundarios de *T. cruzi* (Schofield y col., 1999). En el Gran Chaco, *T. sordida*, *T. guasayana* y *T. garciabesi* han sido consideradas como candidatas para la domesticación (Wisnivesky-Colli y col., 1993; Diotaiuti y col., 1995; Noireau y col., 1995; Castanera y col., 1998; Noireau y col., 1999). En

Introducción

Argentina, *T. cruzi* ha sido también aislado en ejemplares peridomésticos de *T. guasayana* (Lauricella y col., 2005).

Los programas de desinfestación domiciliaria han logrado interrumpir la transmisión vectorial en Brasil, Chile y Uruguay, mientras que en Argentina y Bolivia ha disminuido notablemente (Dias y col., 2002; Zaidemberg y col., 2004; OPS, 2006; Guhl, 2009; Salvatella, 2009; Dias, 2012; Zabala, 2012). Esto le ha dado una mayor importancia relativa a otras formas de transmisión como la connatal, transfusional y por trasplante de órganos.

Transmisión congénita

Con una incidencia variable según la región geográfica, entre el 0,1 y el 8 %, la transmisión connatal, también conocida como vertical o congénita, ha sido tradicionalmente la tercera vía en importancia de la infección por *T. cruzi* (Schenone y col., 1985; Zaidemberg y Segovia, 1993; Lorca y col., 1995; Gurtler y col., 2003; Torrico y col., 2004). Sin embargo, con la aplicación de planes de desinsectación que han reducido la transmisión vectorial y con los controles en bancos de sangre que disminuyeron los riesgos transfusionales, la transmisión connatal se ha vuelto un mecanismo relativamente más importante para la persistencia de la infección. En Argentina, el riesgo de transmisión congénita ha sido estimado entre 2,6 % y 7,9 %. La transmisión congénita depende de dos indicadores epidemiológicos básicos: la tasa de prevalencia de infección chagásica en mujeres gestantes y la tasa de incidencia de la transmisión vertical.

La primera varía según las regiones estudiadas, en relación con el grado de endemidad de la infección por *T. cruzi* en los diferentes países y regiones analizadas. En nuestro país la prevalencia de gestantes chagásicas descendió de 4,33 % a 3,29 % de 2006 a 2012 (Arias y col., 2013).

Sumado al fenómeno de migración de las poblaciones hacia zonas no endémicas, esta vía toma particular importancia como mecanismo de urbanización de la infección. Epidemiológicamente, la vía vertical de infección se define si: i) la madre está infectada; ii) el individuo nació y vivió fuera del área endémica (sin viajes a ella) y iii) no recibió transfusiones.

Transmisión oral

Otra fuente de transmisión, epidemiológicamente más importante en los reservorios que en el hombre, es por la ingestión de vectores o huéspedes infectados. Esta forma de transmisión juega un rol importante en el mantenimiento del ciclo silvestre (Zeledon, 1974). En la

Introducción

literatura se han reportado varios brotes de Chagas agudo que han sido atribuidos a la transmisión oral, principalmente en Brasil, debido al consumo de bebidas o alimentos contaminados con heces de triatominos infectados (Pinto y col., 2004; Benchimol Barbosa, 2006; Alarcon de Noya y col., 2010)

Transmisión transfusional

En las últimas décadas, las dificultades económicas en América Latina han estimulado la migración desde zonas rurales hacia zonas urbanas, concentrando en estas más del 60 % de la población. Dicho fenómeno reduce la exposición al vector infectado pero aumenta la probabilidad de transmisión por transfusión, la cual presenta una incidencia calculada en un 5 a 20 % (Schmunis, 1999). Además, la infección transfusional se ha convertido en un serio problema en los países desarrollados no endémicos debido a la migración de pobladores infectados provenientes de regiones endémicas (OMS, 2002). En todos los casos, la población de riesgo está constituida principalmente por los individuos poli-transfundidos (pacientes hemofílicos y sometidos a diálisis).

Trasplante de órganos

La transmisión por trasplante de órganos provenientes de personas infectadas con *T. cruzi* también ha sido reportada (Riarte y col., 1999; Barcan y col., 2005). Estos casos, al igual que los trasplantes a personas ya infectadas por *T. cruzi*, presentan una problemática particular debido a la inmunosupresión post-trasplante del receptor y deben ser monitorizados. En los casos en que se detectan parásitos en sangre por el método de Strout, chagomas en la piel o nidos de amastigotes en muestras de biopsias, es recomendable que el paciente sea medicado con drogas anti-parasitarias (Diez y col., 2007).

Fases de la enfermedad

Uno de los problemas primarios de la epidemiología parasitaria, es la correlación entre los síntomas de la enfermedad y la presencia del agente causal en el huésped afectado. Es importante confirmar que la presencia del parásito sea responsable del desencadenamiento de los síntomas característicos de la enfermedad. En la gran mayoría de las parasitosis humanas, esta asociación queda claramente establecida. Por ejemplo, en la leishmaniasis tegumentaria las úlceras de la piel constituyen una consecuencia directa de la presencia de los parásitos (amastigotes) como agentes causantes de la lesión. En otras parasitosis sin embargo, la asociación entre el parásito y los síntomas de la enfermedad puede ser más compleja, como es

Introducción

el caso de la enfermedad de Chagas. Los parásitos en diferentes regiones geográficas infectan a los humanos produciendo un espectro variable de formas clínicas de la enfermedad (Vallejo, 2001)

T. cruzi es un parásito que se duplica intracelularmente y una vez dentro del huésped tiene el potencial de infectar distintos tipos de células nucleadas (Burleigh y Andrews, 1995).

Actualmente se definen 2 fases en la infección: aguda y crónica (Reunión Final del Consenso Internacional sobre Etapa Indeterminada de la Enfermedad de Chagas, Buenos Aires, 2010). Las alteraciones descritas en cada una de estas fases suelen ser diversas y dependen tanto del contexto genético del huésped, de la edad, su estado inmunológico y nutricional, como de las características biológicas del parásito (cepa, virulencia, inóculo).

Fase aguda

La fase aguda de la infección abarca un período de 4 a 8 semanas luego de la entrada del parásito al huésped mamífero. En algunos casos la infección aguda puede presentar signos de puerta de entrada: tal es el caso del chagoma de inoculación, una lesión cutánea, que se presenta más frecuentemente en la cara y las extremidades por ser los sitios más expuestos a las vinchucas. Muy típico también es el de la región ocular llamado signo de Romaña-Mazza. Esta etapa se caracteriza por una elevada proliferación intracelular del parásito y por su presencia en circulación. En general, no se observan manifestaciones clínicas importantes, pudiéndose presentar un cuadro febril pasajero con signos o síntomas inespecíficos (Brenner y col., 2000). Rara vez se describen casos agudos con hepatoesplenomegalia, anemia y/o trombocitopenia. Excepcionalmente, y solo en niños o pacientes inmunocomprometidos, pueden presentarse formas severas con miocarditis aguda o meningoencefalitis capaces desencadenar la muerte (OMS, 2002).

La existencia de una relativamente elevada parasitemia durante esta fase permite realizar el diagnóstico de la infección por métodos parasitológicos directos.

Ante un avance favorable, la respuesta inmune controla la carga parasitaria en circulación y tejidos (Moncayo y Ortiz Yanine, 2006), dando paso a la etapa crónica de la infección.

Fase crónica

Una vez superada la fase aguda se desarrolla un proceso inflamatorio crónico con un incremento del daño celular que conduce a un deterioro de la función cardíaca (Kierszenbaum, 2005).

Introducción

Han sido descritas tres formas para la fase crónica de la infección: la *forma indeterminada*, en la cual la mayoría de los pacientes continúa sin presentar síntomas por el resto de sus vidas, se caracteriza por ser asintomática y presentar electrocardiografía y radiografía de tórax normales, pero con serología positiva para *T. cruzi* (Coura, 2003); la *forma digestiva*, con megasíndromes de esófago o colon; y la *forma cardíaca* que se caracteriza por compromiso de la función cardíaca y disturbios en el sistema nervioso periférico (Manoel-Caetano y Silva, 2007). Aproximadamente un 30 % de las personas infectadas, por razones aún no determinadas, desarrollan esta cardiopatía de expresión clínica variada (Higuchi y col., 2003), la expresión más devastadora de esta enfermedad (Manque y col., 2011), que afecta al desarrollo económico del país ya que involucra personas en edades productivas.

La información acerca de los mecanismos celulares y moleculares por los cuales *T. cruzi* afecta la función cardiovascular en pacientes y modelos experimentales, es todavía limitada. Se han postulado diferentes hipótesis para explicar la fisiopatogenia de la enfermedad (Gutierrez y col., 2009); sin embargo, ninguna de ellas justifica de manera independiente las variedades evolutivas diversas, difíciles de pronosticar, y las alteraciones cardíacas en los distintos estadios. Estas hipótesis tampoco explican por qué el 30 % de las personas infectadas evolucionan hacia una enfermedad cardíaca mientras que el 70 % restante permanece asintomático, aunque con serología positiva persistente, por el resto de sus vidas.

Manifestaciones clínicas

Cardiopatía chagásica crónica (CCC):

Se presenta en 10 a 30 % de estos pacientes. Se caracteriza por su gravedad y representa la principal causa de muerte de estos enfermos. Los síntomas más frecuentes son palpitaciones y disnea de esfuerzo. La cardiopatía evoluciona a la insuficiencia cardíaca. Las arritmias son frecuentes y variadas, todos signos de mal pronóstico. En un comienzo, la CCC puede ser asintomática, pero con evidentes alteraciones electrocardiográficas. Los pacientes refieren palpitaciones, disnea, lipotimia y, raramente, se encuentran soplos cardíacos. La enfermedad lleva a la insuficiencia cardíaca, que junto con las arritmias, son la causa de muerte de estos pacientes. La incidencia de la progresión de la cardiopatía chagásica es de 24,8 % y la de las complicaciones es de 3,5 % en pacientes tratados y 16,9 % en los no tratados (Duffy, 2010).

Esofagopatía chagásica:

Conocida como megaesófago, aperistalsis o acalasia del esófago. Se diagnostica, frecuentemente, antes de los 40 años de edad. El esófago se presenta dilatado en diferentes

Introducción

grados y más tardíamente elongado (dolicoomegaesófago). Tiende a la hipertrofia de las capas musculares y en la mucosa se producen paraqueratosis. Microscópicamente existe destrucción de las neuronas parasimpáticas con áreas de inflamación crónica, lo que ocasiona la pérdida progresiva de la coordinación motora y de la capacidad contráctil en la manometría esofágica. Luego aparece disfagia, dolor y regurgitación. Es posible que se asocie con megacolon o cardiopatía. Las manifestaciones clínicas, radiología y manometría esofágica permiten efectuar el diagnóstico. Es conveniente realizar endoscopia digestiva alta para descartar la presencia de cáncer (Duffy, 2010).

Colopatía chagásica:

La colopatía se presenta entre los 40 y 50 años de edad. Se produce una disfunción motora de los segmentos del colon, por denervación parasimpática intramural. La alteración toma, preferentemente, el sigmoides y el recto, originando una dilatación de esa zona. La expresión clínica básica del megacolon es la constipación progresiva con dificultad para la evacuación. El enfermo suele utilizar laxantes, y enemas y consultar tardíamente. En estos cuadros clínicos se producen períodos de distensión abdominal y, secundariamente, abdomen prominente. Se puede palpar un fecaloma en la fosa iliaca izquierda o directamente al realizar un tacto rectal. Las complicaciones del megacolon chagásico son el vólvulo y la obstrucción intestinal por fecaloma (Duffy, 2010).

El tratamiento en distintos escenarios clínicos

En lo que se refiere al tratamiento actual de la enfermedad, las drogas disponibles no sólo no son efectivas para la eliminación del parásito, sino que son altamente tóxicas para el huésped (Guhl, 2007). Hasta el momento, son dos los fármacos que se utilizan para tratar la enfermedad de Chagas: nifurtimox (Lampit, Bayer HealthCare) y benznidazol (ABARAX®, ELEA) (Bellera, 2014; Tarragona y col., 2013; Salvatella, 2016). Estas drogas presentan severos efectos secundarios debido a que no actúan de forma específica sobre el parásito (Urbina, 2010). A modo de ejemplo, benznidazol se recomienda para el tratamiento de la infección aguda, donde ha demostrado una efectividad del 71,5 % en casos tratados dentro los primeros 4 meses, y también se prescribe para tratar casos de infección congénita, en este caso con un 97,9 % de efectividad si el tratamiento se desarrolla durante los primeros 6 meses de vida. Sin embargo, ninguno de los dos fármacos muestra efectividad en el tratamiento de la forma crónica de la enfermedad (5,9 % para benznidazol), la cual es la presentación más frecuente de la enfermedad (Urbina, 2010; Morillo y col., 2015).

Introducción

Debido a la falta de eficacia de dichos tratamientos resulta de capital importancia identificar factores relacionados con la amplia gama de signos clínicos que caracterizan a la enfermedad. Como se mencionó anteriormente, esta variedad de manifestaciones clínicas puede explicarse en parte por la heterogeneidad genética de *T. cruzi* (Moncayo, 2003). Una gran diversidad de cepas de *T. cruzi* con diferentes características en lo que se refiere a respuestas biológicas, inmunológicas, genéticas, moleculares y farmacológicas han sido aisladas de diferentes fuentes (Andrade y col., 1985; Filardi y Brener, 1987; Brener, 1992; Oliveira y col., 1997; Gomes y col., 1998).

Una de las diferencias que presentan las distintas cepas (compuestas por parásitos con características similares, usualmente clones obtenidos en laboratorio) o aislamientos (obtenidos a partir de un insecto vector o un hospedador mamífero; pueden estar compuestos por una mezcla de cepas) de este parásito es un marcado tropismo tisular diferencial a los órganos del huésped, que puede variar en los distintos momentos de la infección (Andrade y Magalhães, 1997; Vago y col., 2000; Mejia y Triana, 2005; Andrade y col., 2010; Roellig y col., 2010; Ferreira Bellini y col., 2012; Cura y Schijman, 2013; Lo Presti y col., 2014). La distribución de estas diferentes poblaciones del parásito en un mismo individuo es un factor que podría influir o determinar el curso clínico de la enfermedad, originando la amplia variabilidad clínica encontrada en pacientes y modelos experimentales.

Por otro lado, algunos estudios han revelado una alta incidencia de infecciones mixtas (con varias cepas en un mismo individuo) en humanos (Solari y col., 2001) y en vectores (Bosseno y col., 2000), lo que confirmaría la relevancia de este parámetro en la evolución de la enfermedad.

En los últimos años ha habido un progreso significativo en la comprensión de la diversidad biológica y genética del agente etiológico, así como de los polimorfismos poblacionales asociados con la susceptibilidad a esta enfermedad. Sin embargo, muchos otros aspectos tales como las interacciones parásito-hospedador, los mecanismos genéticos de la interacción celular, la variabilidad genética, y el tropismo no son suficientemente conocidos (Ferreira Bellini y col., 2012).

Es por ello que proponemos determinar la importancia que tiene la composición genética del aislamiento de *T. cruzi* que infecta al huésped y/o la de las poblaciones diferentes que pueden aparecer en sangre, músculo cardíaco y músculo esquelético. Estos resultados contribuirán al entendimiento de las variabilidades clínicas y facilitarán el establecimiento de un pronóstico y tratamiento adecuados de la enfermedad.

Introducción

OBJETIVOS:

- Conocer la distribución de distintos aislamientos de *Trypanosoma cruzi* en tejidos de animales infectados que cursan la etapa aguda de la infección experimental.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar la distribución de distintas combinaciones de aislamientos de *Trypanosoma cruzi* en sangre, corazón y músculo esquelético de animales infectados que cursan la etapa aguda de la infección experimental.
- Determinar el linaje o UDT al que pertenecen los aislamientos mediante análisis de ADN.
- Caracterizar las diferentes poblaciones presentes en cada tejido mediante la digestión con enzimas de restricción.

MATERIALES Y MÉTODOS

Parásitos para la infección experimental

Se utilizaron 4 aislamientos/cepas de *T. cruzi*: la cepa Tulahuen, aislada en 1945 a partir de un individuo de *T. infestans* encontrado en Chile; el aislamiento SGO Z12 obtenido de un insecto vector de Santiago del Estero, zona endémica de nuestro país (Bustamante y col., 2003) y caracterizado isoenzimáticamente como perteneciente al zimodema 12 (Montamat y col., 1996); y dos aislamientos (Lucky y Casibla) obtenidos de pacientes con Chagas congénito provenientes de área endémica (Lo Presti y col., 2014). Todos los aislamientos/cepas han sido mantenidos en el laboratorio por infecciones sucesivas cada 15 días en ratones Albino suizos.

Infección de los ratones

Ratones Albino suizos adultos, machos y hembras exocriados (mediante cruces entre individuos no consanguíneos), con un peso promedio de $30 \pm 1g$, fueron inoculados intraperitonealmente con cada uno de los aislamientos del parásito o con una mezcla de dos aislamientos (50 tripomastigotes de cada aislamiento). Se infectaron 10 ratones con cada aislamiento o combinación (Tabla 3).

Tabla 3: Grupos experimentales

<i>Grupos</i>	<i>Aislamientos</i>
1	Tulahuen (cepa)
2	SGO Z12
3	Lucky
4	Casibla
5	Tulahuen+SGO Z12
6	Tulahuen+Lucky
7	Tulahuen+Casibla
8	SGO Z12+Lucky
9	SGO Z12+Casibla
10	Lucky+Casibla

Materiales y Métodos

El objetivo de incluir estos grupos doblemente infectados fue verificar si la distribución de los parásitos se ve afectada por la presencia de un mayor número de aislamientos en un mismo huésped; el inóculo de parásitos por lo tanto fue elegido de modo tal que pueda ser comparado con cada uno de los grupos infectados con un solo aislamiento (de forma que tengan la misma cantidad de parásitos correspondientes a cada aislamiento).

Los animales fueron mantenidos en condiciones controladas de luz (12 h-luz, 12 h-oscuridad), temperatura ($25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$) y humedad ($55 \pm 10\%$), y alimentados con ración comercial y agua *ad libitum*. Todos los procedimientos han sido aprobados por el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio de la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad Nacional de Córdoba (Tolosa y col., 2010).

Parasitemia y sobrevida

El seguimiento de los niveles de parásitos en sangre de todos los grupos experimentales infectados, se realizó en cámara de Neubauer, en muestras obtenidas de la cola de los ratones cada 7 días, hasta el día 35 post infección (p.i.).

La sobrevida de cada uno de los grupos fue monitoreada diariamente.

De los ratones supervivientes de cada grupo se eligieron 3 animales al azar (Mejía y Triana, 2005), para ser sacrificados a los 35 días post infección (d.p.i.), que corresponden a la etapa aguda de la infección experimental (Bustamante y col., 2003a; Lo Presti y col., 2006). Se recolectó la sangre de los animales por decapitación y se les extrajo el corazón y muestras de músculo esquelético.

Las muestras de tejido recolectadas se dividieron en dos y se analizaron, por un lado, mediante estudios histológicos y, por otro, junto a las muestras de sangre, para verificar la presencia del parásito y su tipificación mediante PCR.

Estudios histológicos

Las muestras de corazón y músculo esquelético de los ratones infectados fueron fijadas en formol bufferado (10 %) y embebidas en parafina. Los cortes de 5 μm de espesor fueron coloreados con hematoxilina-eosina. Un total de 3 cortes de cada órgano de cada animal (n=3

Materiales y Métodos

por grupo) fueron analizados con aumentos totales de 40X, 100X, 200X y 400X. Se tomaron como controles secciones de corazón y músculo esquelético de ratones no infectados (n=3). Las imágenes fueron analizadas en búsqueda de la presencia de infiltrados inflamatorios y nidos de amastigotes.

Cuantificación de infiltrados inflamatorios: para cuantificar el área cubierta por infiltrados inflamatorios en los cortes de corazón y músculo esquelético, se analizaron las fotografías tomadas a un aumento 40X con el programa AxioVision 4.8. Para ello se tomó como 100 % el área total del corte de cada uno de los tejidos y se cuantificó el porcentaje de la misma cubierta con infiltrados.

Extracción del ADN de muestras de sangre y de tejido

Las muestras de sangre de cada ratón se mezclaron con igual volumen de guanidina 6M / EDTA 0,2 M (Ávila y col., 1991) y las muestras de tejido (corazón, y músculo esquelético) se procesaron mediante lisis con CTAB (bromuro de cetil-trimetilamonio – Levitan y Grosberg, 1993).

El ADN se extrajo por técnicas convencionales con fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (Lachaud y col., 2001) y se precipitó con etanol. Finalmente la solución se resuspendió en agua estéril libre de nucleasas y se conservó a -20 °C hasta su uso (Wincker y col., 1994) para la amplificación del contenido de ADN del parásito y su tipificación por PCR.

Detección y tipificación molecular del linaje de *T. cruzi* presente en cada muestra mediante PCR

La presencia de *T. cruzi* en cada muestra se determinó mediante la amplificación de un fragmento de 188 pb correspondiente al ADN nuclear del parásito utilizando dos cebadores específicos: **TCZ-1** (5'CGA GCT CTT GCC CAC ACG GGT GCT 3') y **TCZ-2** (5'CCT CCA AGC AGC GGA TAG TTC AGG 3') (Virreira y col., 2003).

La tipificación molecular de *T. cruzi* en las muestras de sangre y de tejido de cada ratón en la etapa aguda (35 d.p.i.) se determinó mediante la amplificación por PCR de tres fragmentos diferentes que permitieron, en conjunto, determinar el linaje o UDT de *T. cruzi* presente en cada tejido (Brisse y col., 2001; Steindel y col., 2008; Velázquez y col., 2008; Ramírez y col., 2010) (figura 5):

Materiales y Métodos

- El espaciador intergénico de los genes del mini-exón, utilizando un pool de cebadores (PCR Multiplex): **TC1** (5'-GTG TCC GCC ACC TCC TTC GGG CC), **TC2** (5'-CCT GCA GGC ACA CGT GTG TGT G) y **TC** (5'-CCC CCC TCC CAG GCC ACA CTG) (Souto y col., 1996; Mejía-Jamilló y col., 2009).
- El gen de la subunidad 24S α del ARN ribosómico, utilizando los cebadores **D71** (5'-AAG GTG CGT CGA CAG TGT GG) y **D72** (5'-TTT TCA GAA TGG CCG AAC AGT) (Souto y col., 1996).
- El gen de la subunidad 18S del ARN ribosómico, utilizando los cebadores **V1** (5'-CAA GCG GCT GGG TGG TTA TTC CA) y **V2** (5'-TTG AGG GAA GGC ATG ACA CAT GT) (Clark y Pung, 1994).

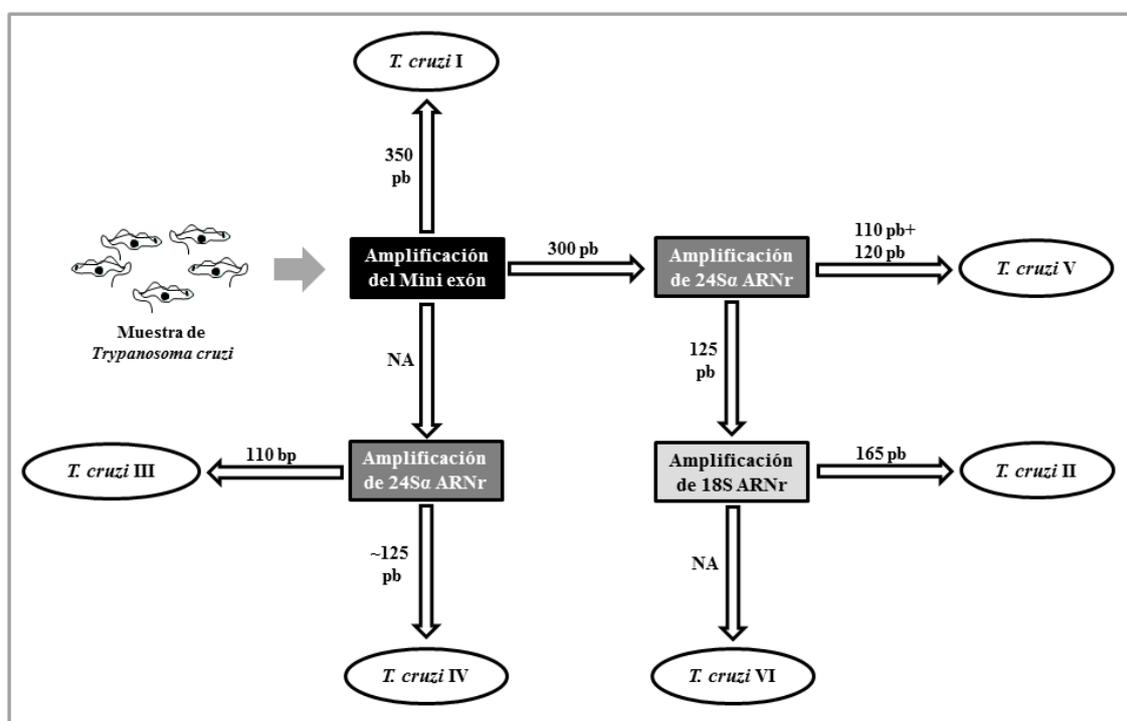


Figura 5: Algoritmo utilizado para la clasificación del linaje de *T. cruzi* utilizando tres marcadores moleculares (adaptado de Ramírez y col., 2010). NA: no amplifica; pb: pares de bases.

La presencia de inhibidores en cada una de las muestras se descartó mediante la amplificación de un gen constitutivo del huésped (β -actina) de 289 pb, utilizando los cebadores correspondientes: **β -act-F** (5'CGG AAC CGC TCA TTG CC 3') and **β -act-R** (5'AAC CAC ACT GTG CCC ATC TA 3') (Velázquez y col., 2014).

Materiales y Métodos

Los componentes de cada una de las reacciones y las condiciones de amplificación para cada PCR se describen en las tablas 4 y 5 respectivamente. En todos los casos, los productos de PCR se separaron mediante geles de agarosa al 2,5 % teñido con bromuro de etidio y se observaron bajo luz UV. Cada reacción se realizó por triplicado.

Tabla 4: Componentes de cada una de las reacciones para la amplificación de los diferentes marcadores moleculares.

Marcador molecular	Tris-Cl (pH 8,4)	KCl	Cl ₂ Mg	dNTPs	Taq	Cebadores	ADN (muestra)	Volumen final
TCZ	10 mM	50 mM	1,5 mM	200 μM	0.5 U	25 μmols	~ 2,5 ng	25 μL
Mini-exón	10 mM	50 mM	1,75 mM	200 μM	1 U (HS)	25 μmols	~ 5 ng	50 μL
24Sα ARNr	10 mM	50 mM	2 mM	200 μM	1 U	20 μmols	~ 4 ng	50 μL
18S ARNr	10 mM	50 mM	2 mM	200 μM	1 U (HS)	20 μmols	~ 4 ng	50 μL
β-actina	10 mM	50 mM	1,5 mM	200 μM	0.5 U	10 μmols	~ 2,5 ng	25 μL

HS: Taq Polimerasa Hot start.

Tabla 5: Condiciones de reacción para la amplificación de cada uno de los marcadores moleculares

Marcador molecular	Desnaturalización inicial	Número de ciclos	Cada ciclo consistió de:			Extensión final
			Desnaturalización	Annealing	Extensión	
TCZ	4 min; 95°C	40	30 s; 95°C	30 s; 60°C	30 s; 72°C	5 min; 72°C
Mini-exón	2 min; 94°C	30	30 s; 94°C	30 s; 55°C	30 s; 72°C	7 min; 72°C
24Sα ARNr	1 min; 94°C	30	30 s; 94°C	30 s; 60°C	30 s; 72°C	7 min; 72°C
18S ARNr	2 min; 94°C	30	30 s; 94°C	30 s; 50°C	30 s; 72°C	7 min; 72°C
β-actina	4 min; 95°C	30	30 s; 95°C	30 s; 60°C	30 s; 72°C	5 min; 72°C

En todos los casos, las amplificaciones se llevaron a cabo en un Termociclador para ADN (Ivema T-18).

Análisis de la distribución del parásito en los diferentes tejidos por enzimas de restricción

Para caracterizar aún más la distribución diferencial del parásito en los tejidos del huésped (sangre, corazón, músculo esquelético), se realizó el análisis de los fragmentos producidos luego de la digestión con enzimas de restricción (RFLP) del fragmento del mini-exón (300 pb) amplificado anteriormente. Para ello se utilizaron las enzimas Bce AI, Dra III, Fsp I, Rsa I and Bsm AI (New England Biolabs, Inc.), todas ellas elegidas por sus sitios teóricos de corte

Materiales y Métodos

en el fragmento utilizado. En todos los casos se siguieron las recomendaciones del fabricante para las condiciones de digestión. Los fragmentos obtenidos fueron separados por electroforesis en geles de agarosa al 2,5 %, teñidos con bromuro de etidio y observados bajo luz UV.

Análisis de los resultados

Cada PCR (de los diferentes marcadores moleculares) se realizó por triplicado, considerándose negativa luego de tres resultados negativos repetidos; un resultado positivo se consideró suficiente para considerar a la muestra como positiva para ese marcador molecular.

Como se mencionó anteriormente, la determinación del linaje o UDT de *T. cruzi* presente en cada muestra se llevó a cabo siguiendo el algoritmo de Ramírez y col., 2010, modificado para tres marcadores moleculares (figura 5).

Los perfiles de bandas obtenidos luego de los RFLP de las muestras de sangre y de los órganos de cada uno de los ratones infectados se analizaron cualitativamente por observación de los geles. Además, y para lograr una mejor comparación de los resultados, se realizó un análisis independiente de los patrones multibandas obtenidos de sangre, corazón y músculo esquelético para cada ratón.

En los cortes histológicos se cuantificaron los infiltrados inflamatorios utilizando el programa AxioVision 4.8 y se analizaron en búsqueda de nidos de amastigotes; las áreas ocupadas por infiltrados se compararon por Chi cuadrado de Pearson. Las curvas de parasitemia se compararon por análisis multivariado y test de Hotelling y las curvas de sobrevida se realizaron mediante el test de sobrevida de Kaplan Meier. Se consideraron diferencias significativas cuando $p < 0,05$.

RESULTADOS

Parasitemia

La figura 6 representa la evolución de los niveles de parásitos en sangre de los grupos infectados con Tulahuen (grupo 1), SGO Z12 (grupo 2) y la combinación de ambos (grupo 5), hasta los 35 d.p.i. Como puede observarse, el parásito se encontró presente en todos los grupos estudiados a partir de los 7 d.p.i., presentando un pico de parasitemia entre los 21 y los 28 d.p.i. (grupo 1 y 2) y entre los 14 y los 28 d.p.i. (grupo 5). La curva del grupo infectado con la combinación fue significativamente diferente de aquella presentada por los animales infectados con solo una cepa/aislamiento ($P < 0,05$), presentando mayores cantidades de parásitos en todos los puntos, a excepción de los 21 d.p.i. cuando los niveles de parásitos circulantes fueron similares al grupo 2, pero menores al grupo 1.

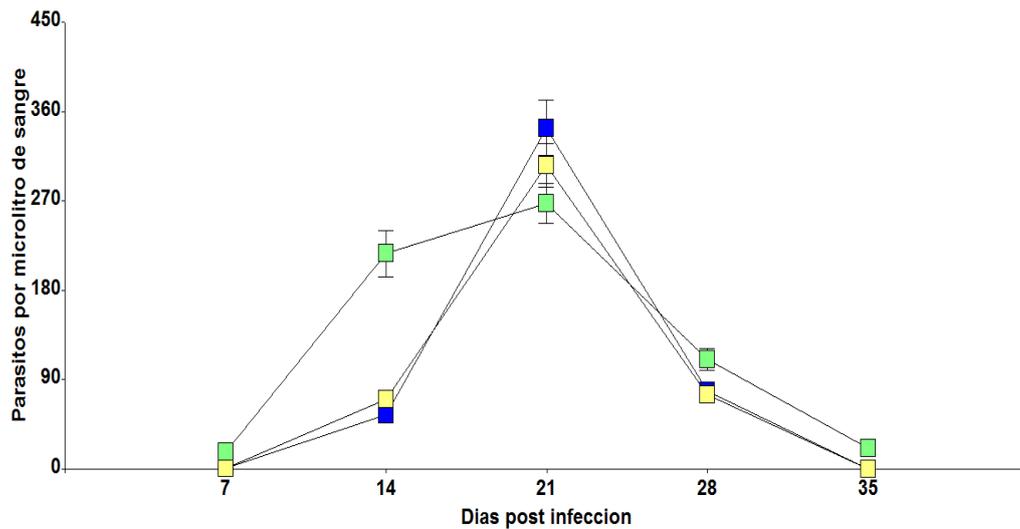


Figura 6: Evolución de los niveles de parásitos circulantes en el grupo 1 (Tulahuen) (■), grupo 2 (SGO Z12) (□) y grupo 5 (Tulahuen+SGO Z12) (■).

Barra: error estándar; n=10 en cada grupo. Se encontraron diferencias significativas entre la curva del grupo 5 vs las curvas de los grupos 1 y 2, que fueron similares entre sí (test de Hotelling: $P < 0,05$).

Resultados

La figura 7 representa la evolución de los niveles de parásitos en sangre de los grupos infectados con Tulahuen (grupo 1), Lucky (grupo 3) y su combinación (grupo 6) hasta los 35 d.p.i. Como puede observarse, el parásito se encontró presente en todos los grupos estudiados a partir del día 7 d.p.i., presentando un pico de parasitemia a los 21 d.p.i. (grupo 1 y 3) y entre los días 14 y 28 d.p.i. (grupo 6). Nuevamente, se encontraron diferencias significativas entre la curva del grupo infectado con la combinación (grupo 6) y las de los grupos infectados con solo una cepa/aislamiento ($P < 0,05$); en este caso, el grupo infectado con la combinación mostró mayor cantidad de parásitos y se mantuvieron por un mayor periodo de tiempo (no llegando a negativizarse a los 35 d.p.i. como los otros dos grupos).

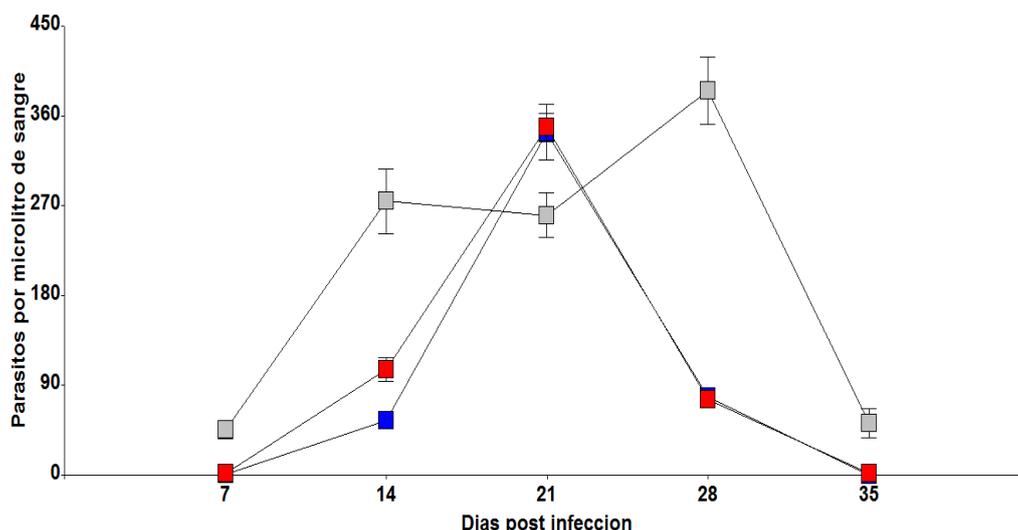


Figura 7: Evolución de los niveles de parásitos circulantes en el grupo 1 (Tulahuen) (■), grupo 3 (Lucky) (■) y grupo 6 (Tulahuen+Lucky) (■).

Barra: error estándar; $n=10$ en cada grupo. Se encontraron diferencias significativas entre la curva del grupo 6 vs las curvas de los grupos 1 y 3, que fueron similares entre sí (test de Hotelling: $P < 0,05$).

La figura 8 muestra la evolución de la parasitemia en los grupos infectados con Tulahuen (grupo 1), Casibla (grupo 4) y con su combinación (grupo 7) hasta el día 35 d.p.i. Nuevamente, el parásito se encontró presente desde el día 7 d.p.i., con un pico a los 21 d.p.i. en todos los grupos. En este caso, se encontraron diferencias significativas entre las curvas de los 3 grupos estudiados ($P < 0,05$), siendo la parasitemia del grupo infectado con la combinación significativamente menor.

Resultados

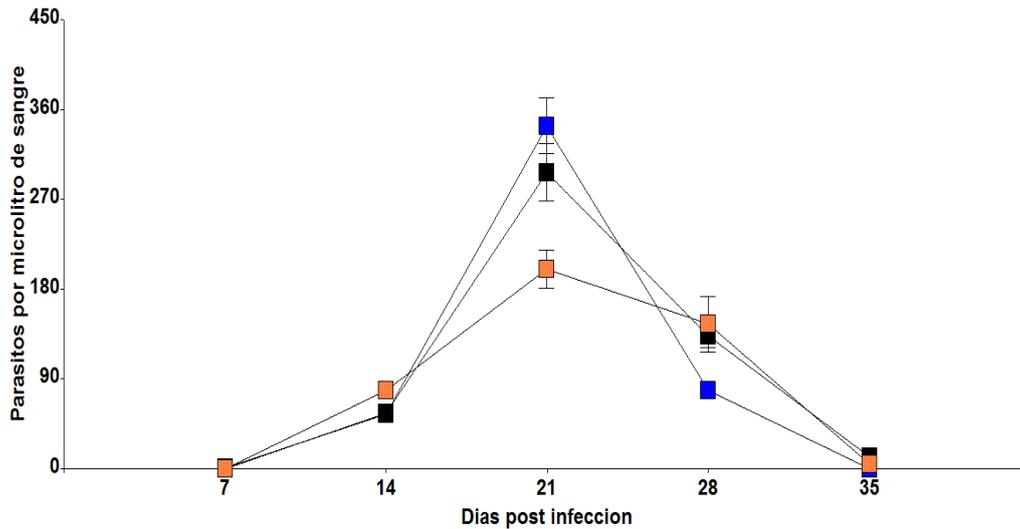


Figura 8: Evolución de los niveles de parásitos circulantes el grupo 1 (Tulahuen) (■), grupo 4 (Casibla) (■) y grupo 7 (Tulahuen+Casibla) (■).

Barra: error estándar; n=10 en cada grupo. Se encontraron diferencias significativas entre las curvas de los tres grupos estudiados (test de Hotelling: $P < 0,05$).

La evolución de los niveles de parásitos circulantes de los grupos infectados con SGO Z12 (grupo 2), Lucky (grupo 3) y con su combinación (grupo 8) hasta los 35 d.p.i. se muestra en la figura 9. Nuevamente en este caso se encontraron diferencias significativas entre las curvas de los 3 grupos estudiados ($P < 0,05$).

Resultados

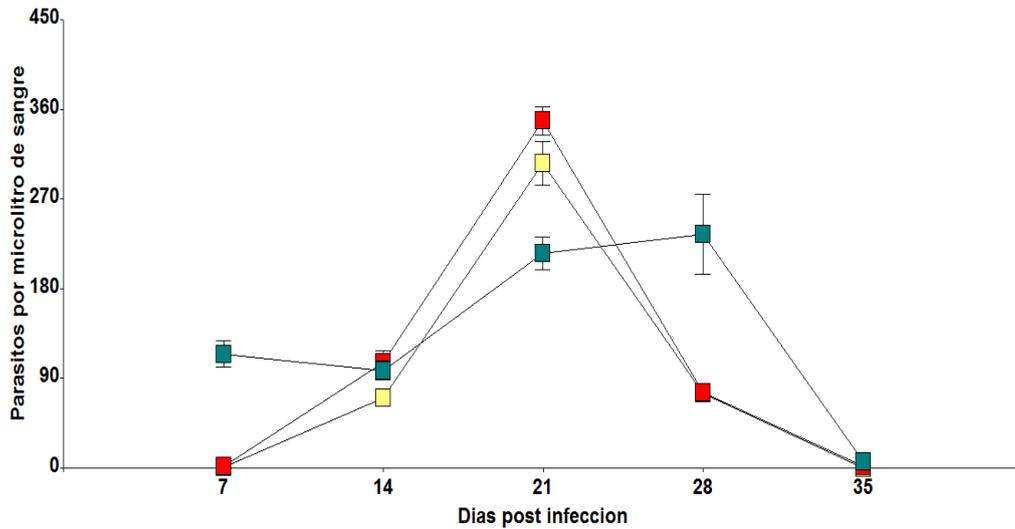


Figura 9: Evolución de los niveles de parásitos circulantes el grupo 2 (SGO Z12) (■), grupo 3 (Lucky) (■) y grupo 8 (SGO Z12+Lucky) (■).

Barra: error estándar; n=10 en cada grupo. Se encontraron diferencias significativas entre las curvas de los tres grupos estudiados (test de Hotelling: $P < 0,05$).

La figura 10 muestra la parasitemia de los grupos infectados con SGO Z12 (grupo 2), Casibla (grupo 4) y su combinación (grupo 9) hasta el día 35 d.p.i. En este caso, los niveles de parásitos en circulación mostrados por el grupo infectado con la combinación de aislamientos (grupo 9) mostraron un pico a los 28 d.p.i. significativamente superior al de los grupos infectados con solo un aislamiento en el mismo momento ($P < 0,05$).

Resultados

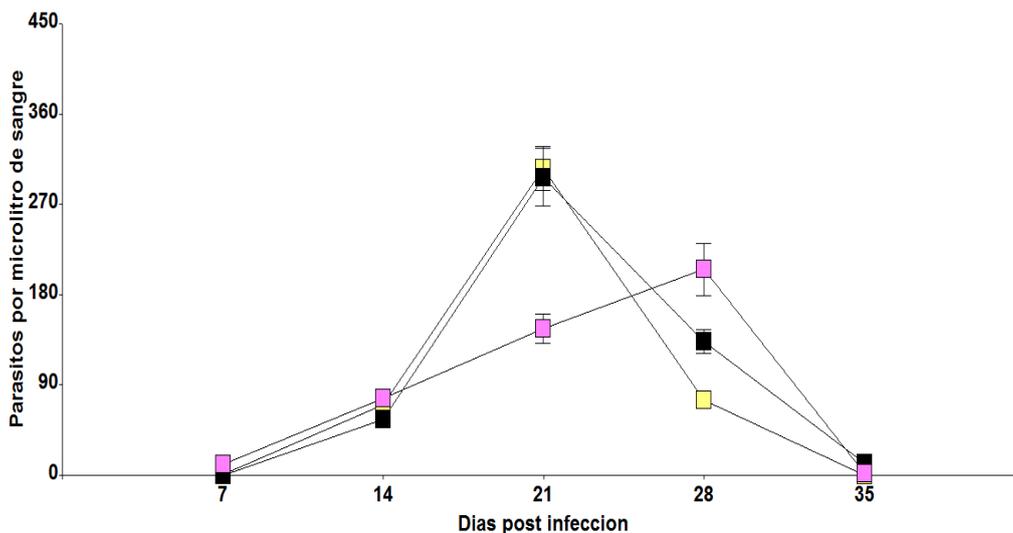


Figura 10: Evolución de los niveles de parásitos circulantes en el grupo 2 (SGO Z12) (■), grupo 4 (Casibla) (■) y grupo 9 (SGO Z12+Casibla) (■).

Barra: error estándar; n=10 en cada grupo. Se encontraron diferencias significativas entre las curvas de los tres grupos estudiados (test de Hotelling: $P < 0,05$).

Por último, la figura 11 muestra la evolución de los niveles de parásitos en sangre de los grupos infectados con Lucky (grupo 3), Casibla (grupo 4) y su combinación (grupo 10). En este caso, la curva presentada por el grupo infectado con la combinación de aislamientos mostró dos picos de parasitemia, uno a los 14 d.p.i. y el otro a los 28 d.p.i., ambos con niveles de parásitos superiores a los presentados por los grupos infectados con solo un aislamiento en esos momentos ($P < 0,05$). Estos últimos grupos, como se mencionó anteriormente, presentaron el pico de parasitemia a los 21 d.p.i.

Resultados

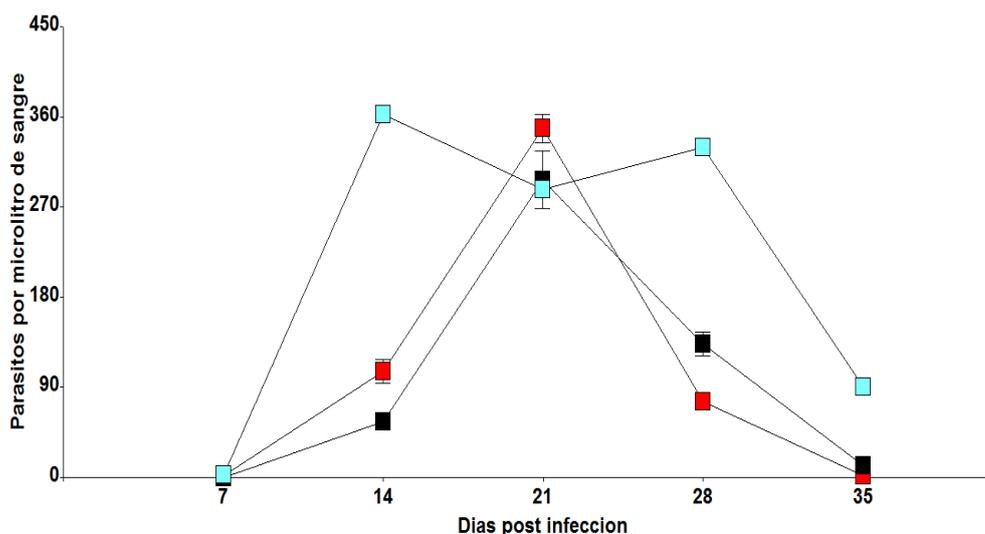


Figura 11: Evolución de los niveles de parásitos circulantes en el grupo 3 (Lucky) (■), grupo 4 (Casibla) (■) y grupo 10 (Lucky+Casibla) (■).

Barra: error estándar; n=10 en cada grupo. Se encontraron diferencias significativas entre las curvas de los tres grupos estudiados (test de Hotelling: $P < 0,05$).

Sobrevida

La figura 12 muestra la sobrevida de los grupos infectados con cada uno de los aislamientos/cepas: Tulahuen (grupo 1), SGO Z12 (grupo 2), Lucky (grupo 3) y Casibla (grupo 4), hasta los 35 d.p.i.

Como puede observarse en la figura, el grupo infectado con el aislamiento Lucky fue el que presentó mayor sobrevida (73 %), siendo esta sobrevida significativamente mayor que la de los grupos infectados con Tulahuen (43 %) y SGO Z12 (37 %) ($P < 0,05$). La sobrevida del grupo infectado con Casibla fue estadísticamente similar a la del resto de los grupos, con un valor intermedio entre el grupo infectado con Lucky y el grupo infectado con Tulahuen.

Resultados

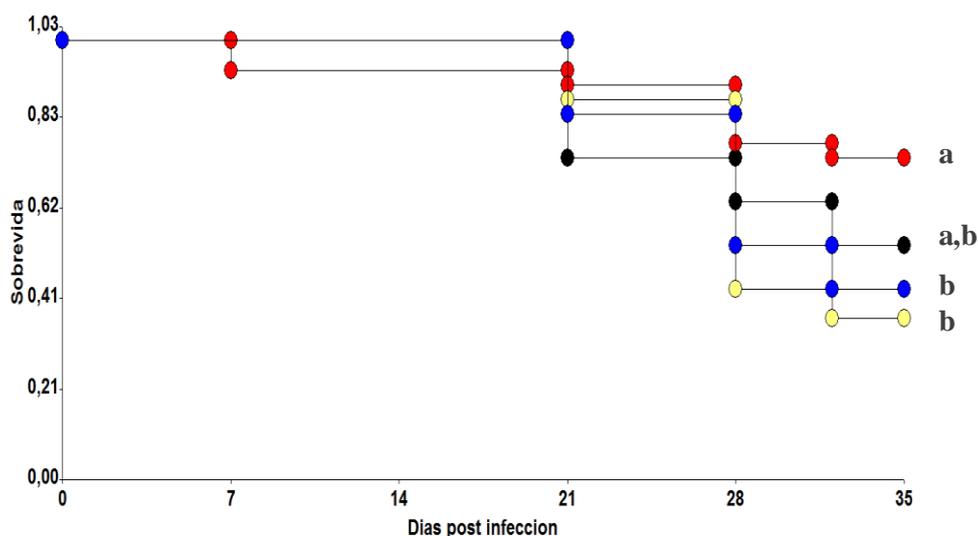


Figura 12: Sobrevida de los grupos infectados con los distintos aislamientos de *Trypanosoma cruzi*, durante la etapa aguda de la infección experimental: grupo 1 (Tulahuen) (●), grupo 2 (SGO Z12) (●), grupo 3 (Lucky) (●) y grupo 4 (Casibla) (●).

Sobrevida presentada en proporción; n=10 en cada grupo. Letras diferentes indican diferencias significativas entre las curvas (test de sobrevivencia de Kaplan Meier: $P < 0,05$).

La figura 13 por su parte muestra la sobrevivencia de los grupos infectados con las distintas combinaciones de cepas/aislamientos: Tulahuen+SGO Z12 (grupo 5), Tulahuen+Lucky (grupo 6), Tulahuen+Casibla (grupo 7), SGO Z12+Lucky (grupo 8), SGO Z12+Casibla (grupo 9), Lucky+Casibla (grupo 10) hasta los 35 d.p.i. Como puede observarse en este caso, entre 23 % y 43 % de los animales de cada grupo sobrevivieron durante la etapa aguda de la infección experimental, siendo los valores de sobrevivencia de todos estos grupos similares entre sí ($P > 0,05$).

Al comparar la sobrevivencia de los grupos infectados con las combinaciones de cepas/aislamientos en relación a los correspondientes grupos infectados con solo uno de ellos, en todos los casos la sobrevivencia del grupo infectado con la combinación mostró una tendencia a ser menor que la del grupo con infección simple; en algunos casos esta diferencia llegó a ser significativa: la sobrevivencia del grupo infectado con SGO Z12+Casibla (20 %) fue menor que la del grupo infectado solo con Casibla (53 %) ($P < 0,05$), la sobrevivencia del grupo infectado con Lucky+Casibla (27 %) fue menor que la del grupo infectado solo con Lucky (73 %) ($P < 0,002$), la sobrevivencia del grupo infectado con Tulahuen+Lucky (23 %) fue menor que la presentada por el grupo infectado solo con Lucky (73 %) ($P < 0,002$) y la sobrevivencia del grupo

Resultados

infectado con SGO Z12+Lucky (27 %) fue menor que la del grupo infectado con Lucky (73 %) ($P < 0,002$).

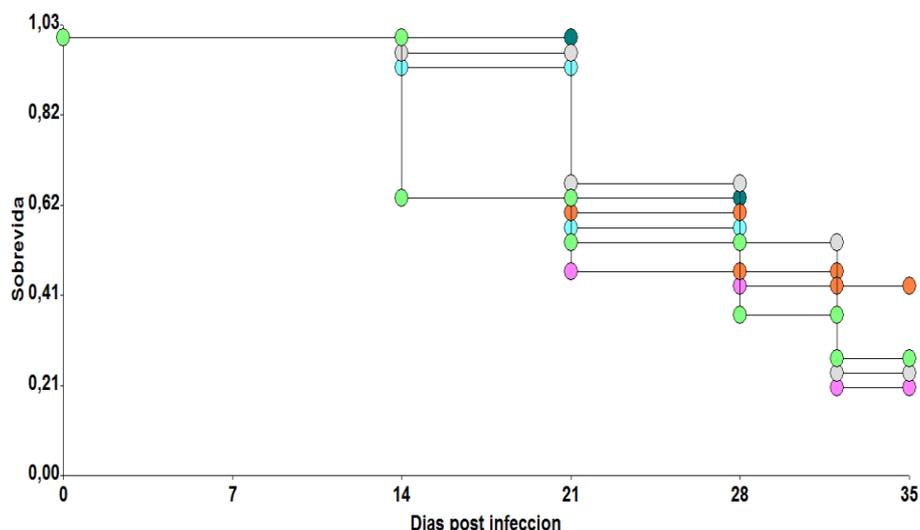


Figura 13: Supervivencia de los grupos infectados con las distintas combinaciones de cepas/aislamientos de *Trypanosoma cruzi*, durante la etapa aguda de la infección experimental: grupo 5 (Tulahuen+SGO Z12) (●), grupo 6 (Tulahuen+Lucky) (●), grupo 7 (Tulahuen+Casibla) (●), grupo 8 (SGO Z12+Lucky) (●), grupo 9 (SGO Z12+Casibla) (●) y grupo 10 (Lucky+Casibla) (●).

Supervivencia presentada en proporción; $n=10$ en cada grupo. No se observaron diferencias entre los aislamientos estudiados (test de supervivencia de Kaplan Meier: $P > 0,05$).

Estudios histológicos

Las figuras 14, 15, 16 y 17 muestran áreas representativas de músculo cardíaco y músculo esquelético de los grupos 1, 2, 3 y 4 respectivamente durante la etapa aguda de la infección experimental (35 d.p.i.).

Las muestras de corazón del grupo 1 (Tulahuen) presentaron un promedio de 0,71 % del corazón cubierto por infiltrados inflamatorios leves a moderados; también se observaron nidos de amastigotes aislados en estas muestras (Figura 14 a – b).

Las secciones del músculo esquelético del mismo grupo también presentaron infiltrados inflamatorios pero de una intensidad superior ($P < 0,05$) (Figura 14 c – d); el área cubierta por

Resultados

infiltrados en este caso es, en promedio de 7,8 %. En estas secciones se encontraron nidos de amastigotes en las fibras musculares de 2 de los 3 ratones analizados.

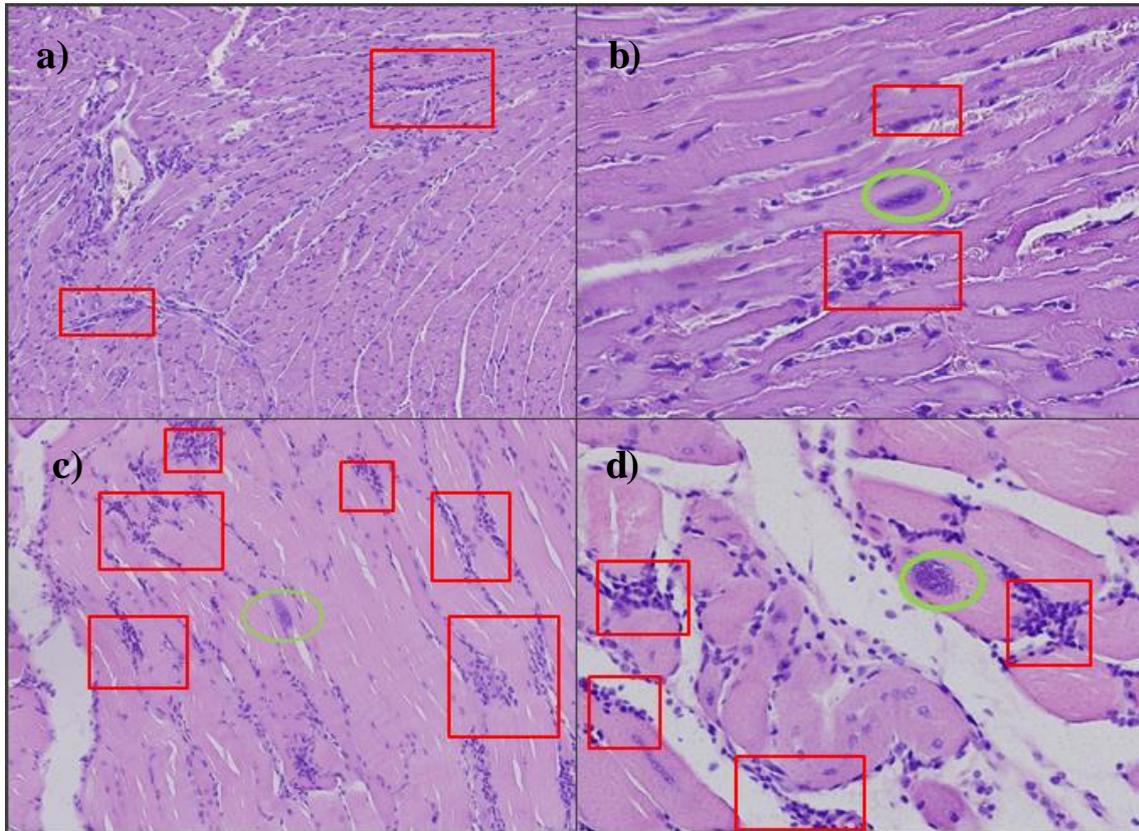


Figura 14: Secciones histológicas correspondientes al grupo 1 (Tulahuen) a los 35 d.p.i. a) corazón, 20 X; b) corazón, 40 X; c) músculo esquelético, 20 X; d) músculo esquelético, 40 X. Infiltrados inflamatorios (□), nidos de amastigotes (○).

Las muestras de corazón del grupo 2 (SGO Z12) presentaron infiltrados inflamatorios muy leves, con una superficie promedio de 0,5 % de la superficie total de la muestra (Figura 15 a - b); no se observó presencia de nidos amastigotes.

Los infiltrados inflamatorios en las secciones de músculo esquelético cubrieron un área mayor (1,8 %; $P < 0,05$) que en los corazones del mismo grupo (Figura 15 c - d). Tampoco se encontraron nidos de amastigotes en las secciones del músculo esquelético.

Resultados

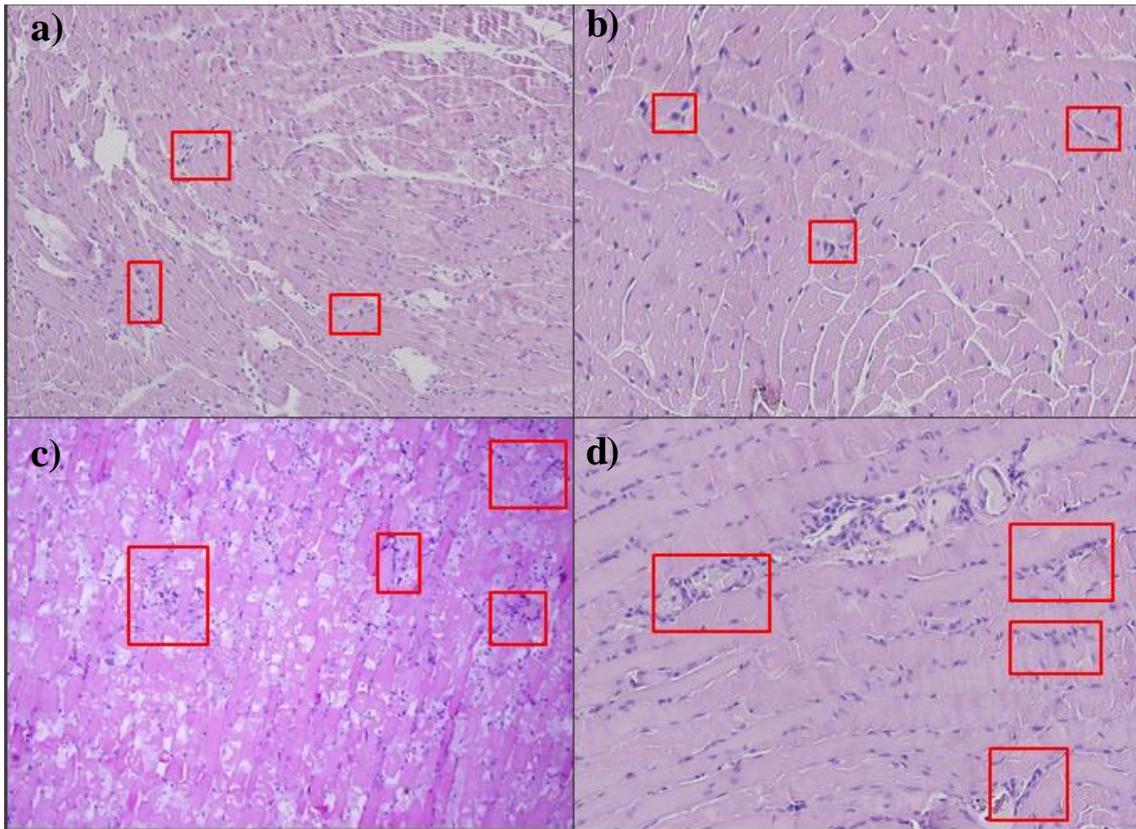


Figura 15: Secciones histológicas correspondientes al grupo 2 (SGO Z12) a los 35 d.p.i. a) corazón, 20 X; b) corazón, 40 X; c) músculo esquelético, 20 X; d) músculo esquelético, 40 X. Infiltrados inflamatorios (□).

Los infiltrados inflamatorios en las muestras de corazón del grupo 3 (Lucky) ocuparon una superficie promedio de 3,32 %; además, se encontraron nidos de amastigotes en la mayoría de las muestras analizadas (Figura 16 a – b).

Las muestras de músculo esquelético presentaron infiltrados inflamatorios leves a severos, con una superficie promedio de 15,16 % de las áreas analizadas ($P < 0,05$ en relación a las muestras de corazón del mismo grupo); varios nidos de amastigotes también se encontraron en todas las muestras de músculo esquelético (Figura 16 c – d).

Resultados

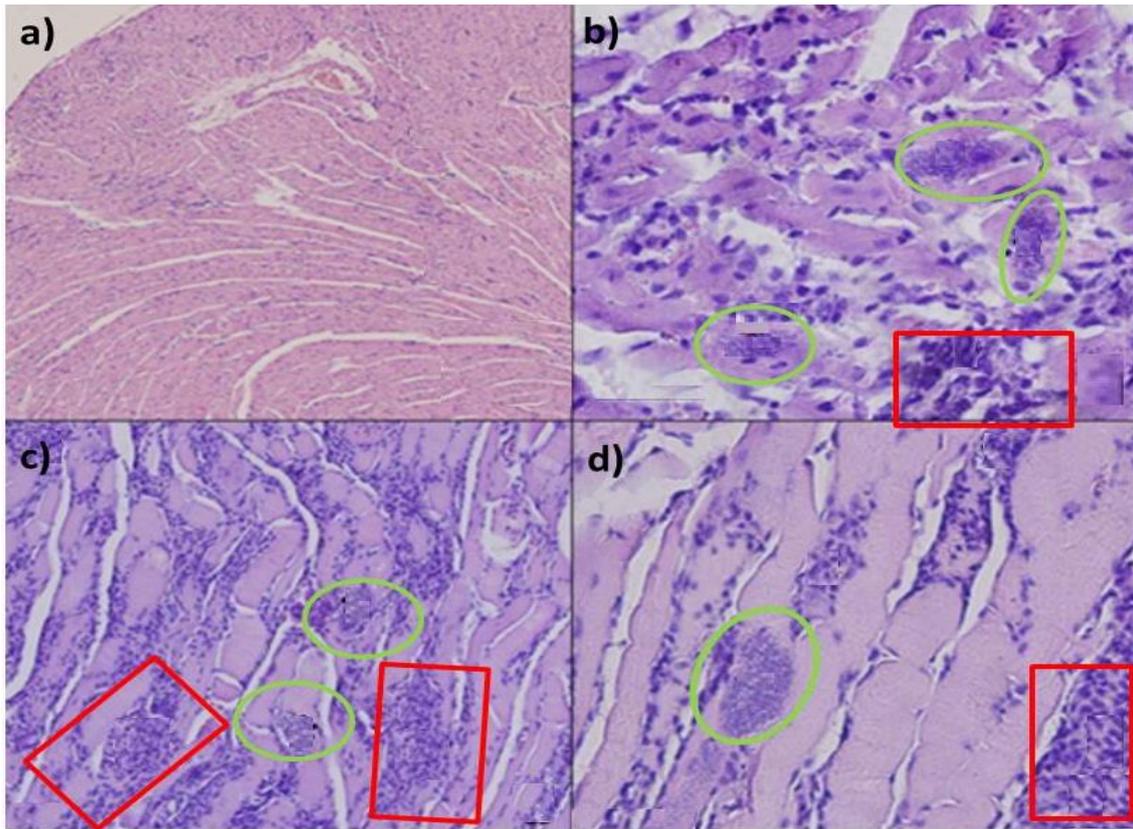


Figura 16: Secciones histológicas correspondientes al grupo 3 (Lucky) a los 35 d.p.i. a) corazón, 20 X; b) corazón, 40 X; c) músculo esquelético, 20 X; d) músculo esquelético, 40 X. Infiltrados inflamatorios (□), nidos de amastigotes (○).

Para el grupo 4 (Casibla) se observaron infiltrados inflamatorios muy leves a moderados en las muestras de corazón, con una superficie promedio de 2,64 % de la superficie total de la muestra; también se observaron nidos de amastigotes en estas muestras (Figura 17 a - b).

Las secciones del músculo esquelético del mismo grupo presentaron infiltrados inflamatorios leves a severos (Figura 17 c - d); el área cubierta por infiltrados en este caso fue en promedio de 9,61 % ($P < 0,05$ en relación a las muestras de corazón del mismo grupo); se encontraron nidos de amastigotes en las secciones de músculo esquelético.

Resultados

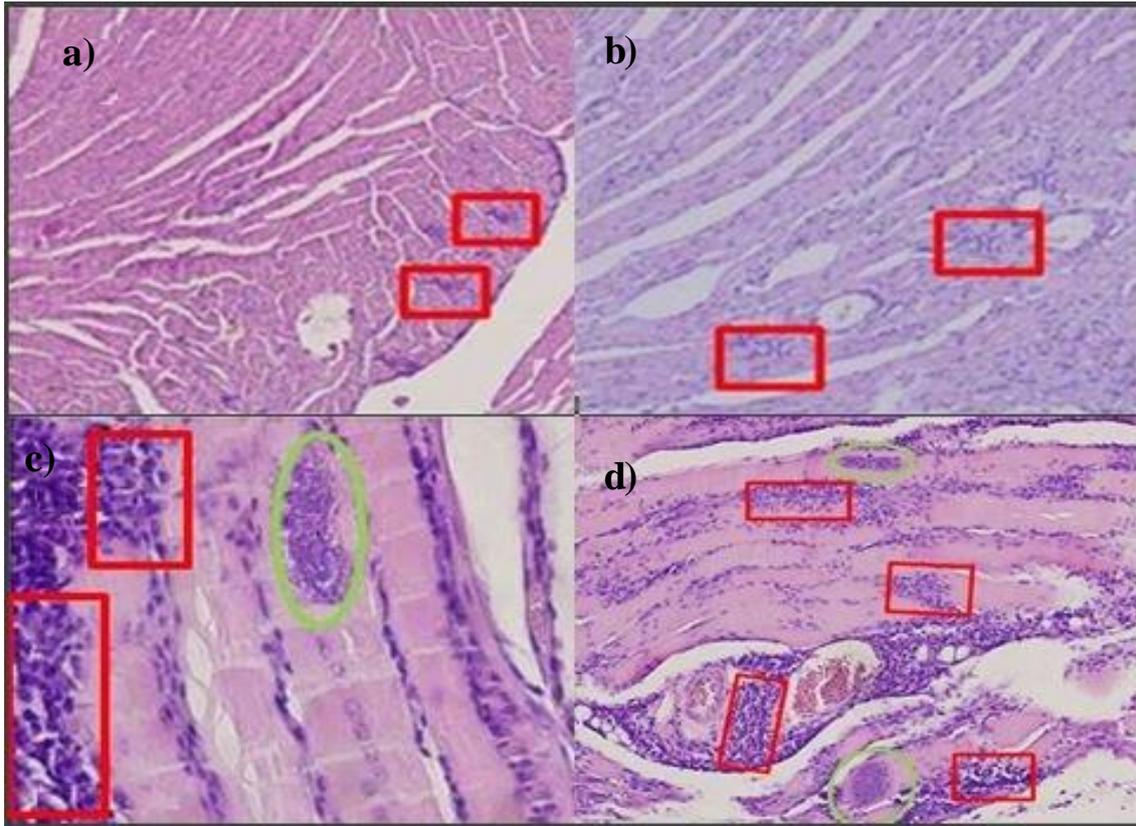


Figura 17: Secciones histológicas correspondientes al grupo 4 (Casibla) a los 35 d.p.i. a) corazón, 20 X; b) corazón, 40 X; c) músculo esquelético, 20 X; d) músculo esquelético, 40 X. Infiltrados inflamatorios (□), nidos de amastigotes (○).

Las figuras 18, 19, 20, 21, 22 y 23 muestran áreas representativas de músculo cardíaco y músculo esquelético de los grupos 5, 6, 7, 8, 9 y 10 respectivamente durante la etapa aguda de la infección experimental (35 d.p.i.).

Las muestras de corazón del grupo 5 (Tulahuen+SGO Z12) presentaron una superficie promedio de infiltrados inflamatorios de 0,78 % del total de la muestra y no se observaron nidos de amastigotes (Figura 18 a – b).

En las secciones de músculo esquelético se observaron infiltrados inflamatorios de leves a severos con un promedio de 5,60 %; se encontraron además, nidos de amastigotes (Figura 18 c – d).

Resultados

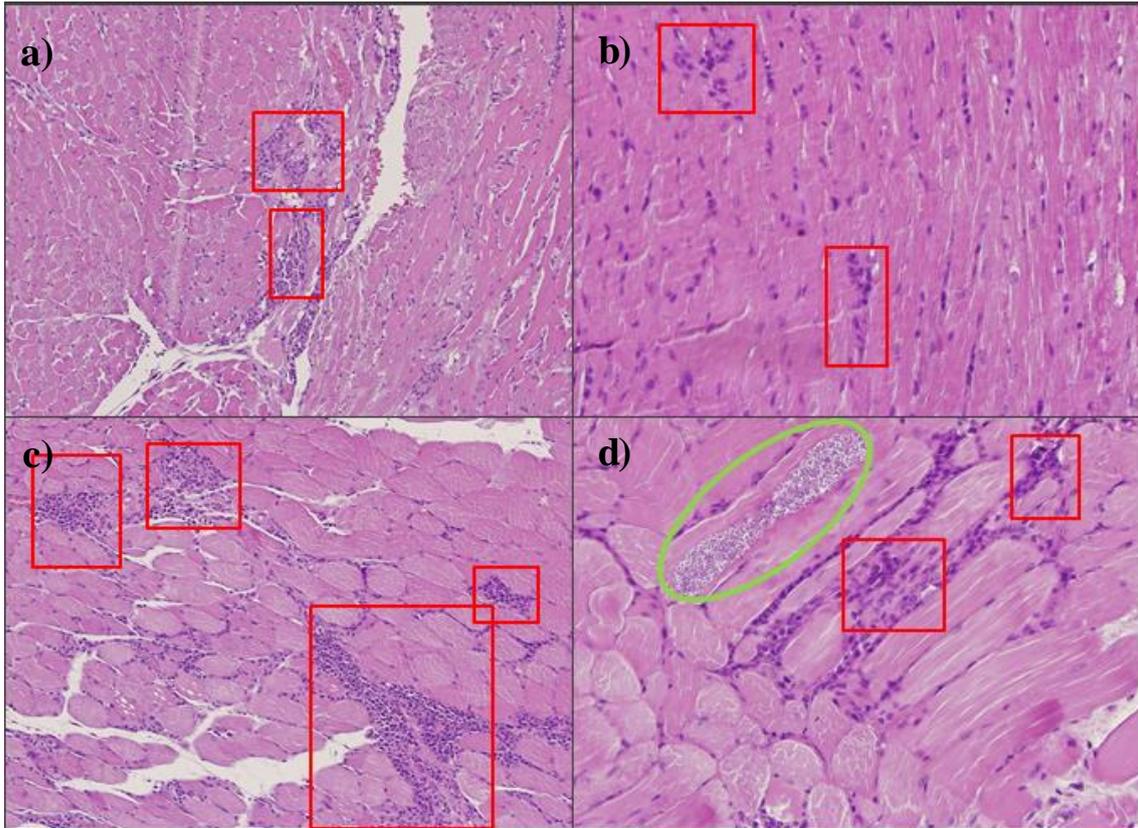


Figura 18: Secciones histológicas correspondientes al grupo 5 (Tulahuen+SGO Z12) a los 35 d.p.i. a) corazón, 20 X; b) corazón, 40 X; c) músculo esquelético, 20 X; d) músculo esquelético, 40 X. Infiltrados inflamatorios (□), nidos de amastigotes (○).

Los infiltrados inflamatorios en las muestras de corazón del grupo 6 (Tulahuen+Lucky) fueron de leves, con una superficie promedio de 0,55 %; no se encontraron nidos de amastigotes (Figura 19 a - b).

El área cubierta por infiltrados inflamatorios en las muestras de músculo esquelético fue en promedio de 6,88 %; éstas tampoco presentaron nidos de amastigotes (Figura 19 c - d).

Resultados

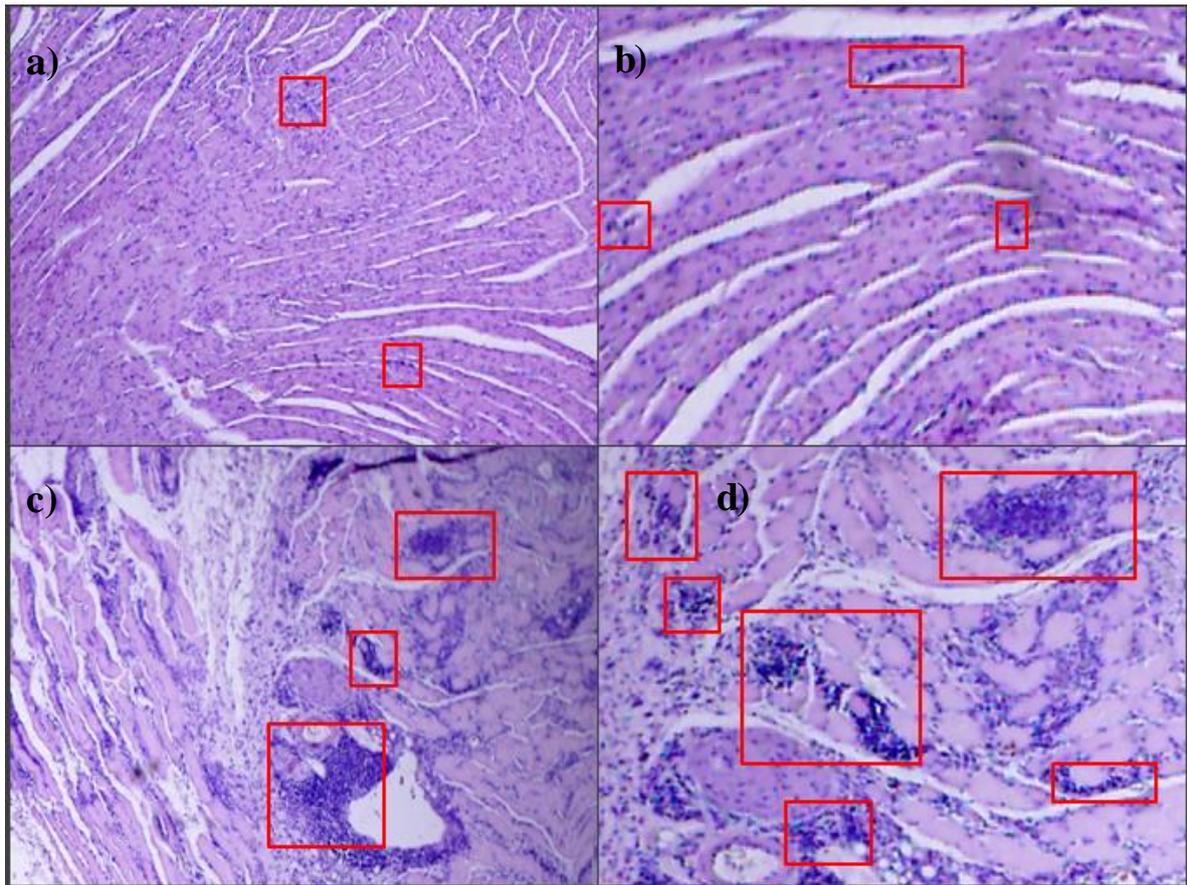


Figura 19: Secciones histológicas correspondientes al grupo 6 (Tulahuen+Lucky) a los 35 d.p.i. a) corazón, 20 X; b) corazón, 40 X; c) músculo esquelético, 20 X; d) músculo esquelético, 40 X. Infiltrados inflamatorios (□).

Las muestras de corazón del grupo 7 (Tulahuen+Casibla) presentaron infiltrados inflamatorios de leves a moderados con una superficie promedio de 2 % del área total del corte analizado (Figura 20 a – b).

En las secciones de músculo esquelético se observaron infiltrados inflamatorios de moderados a severos, con un área cubierta con un promedio de 7,6 % (Figura 20 c – d). No se observaron nidos de amastigotes en ninguno de los dos tejidos analizados para este grupo.

Resultados

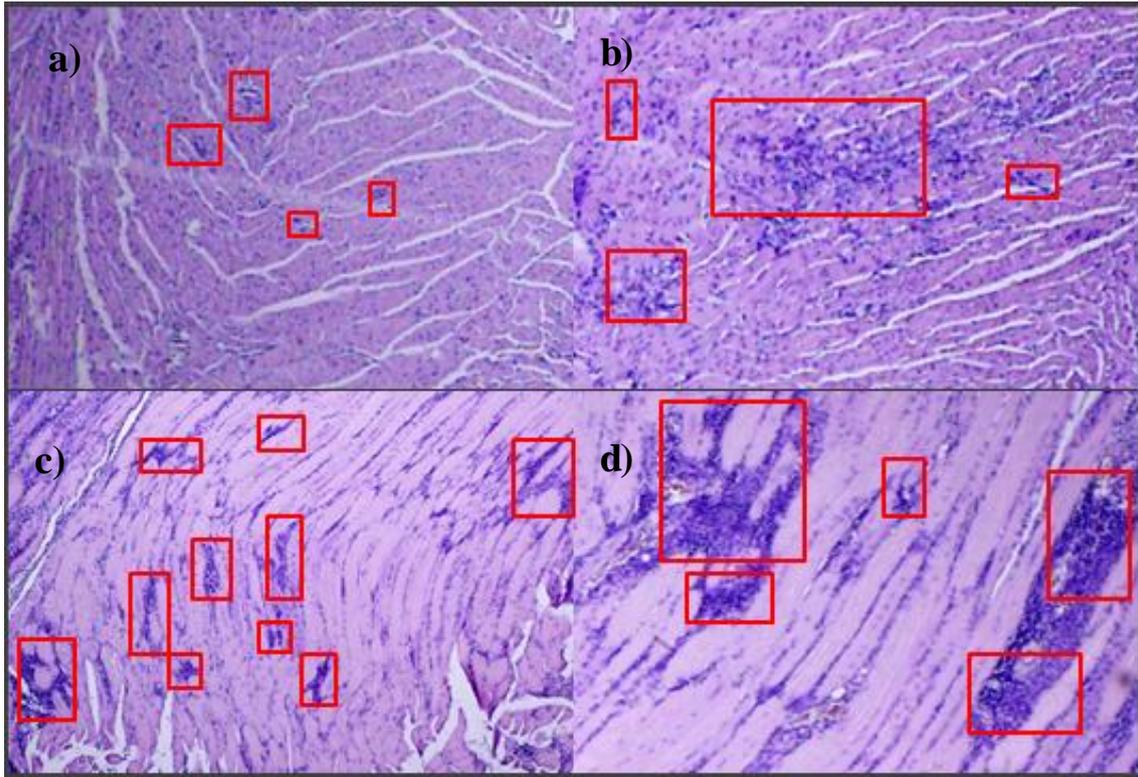


Figura 20: Secciones histológicas correspondientes al grupo 7 (Tulahuen+Casibla) a los 35 d.p.i. a) corazón, 20 X; b) corazón, 40 X; c) músculo esquelético, 20 X; d) músculo esquelético, 40 X. Infiltrados inflamatorios ().

En el grupo 8 (SGO Z12+Lucky) se observaron infiltrados inflamatorios leves con presencia de nidos de amastigotes en corazón, con un promedio de 1,01 % del área total del corte cubierta por infiltrados (Figura 21 a - b).

Las secciones de músculo esquelético presentaron infiltrados inflamatorios de leves a severos, con una superficie promedio de 9,57 % del total de la muestra, se observó también la presencia de nidos de amastigotes (Figura 21 c - b).

Resultados

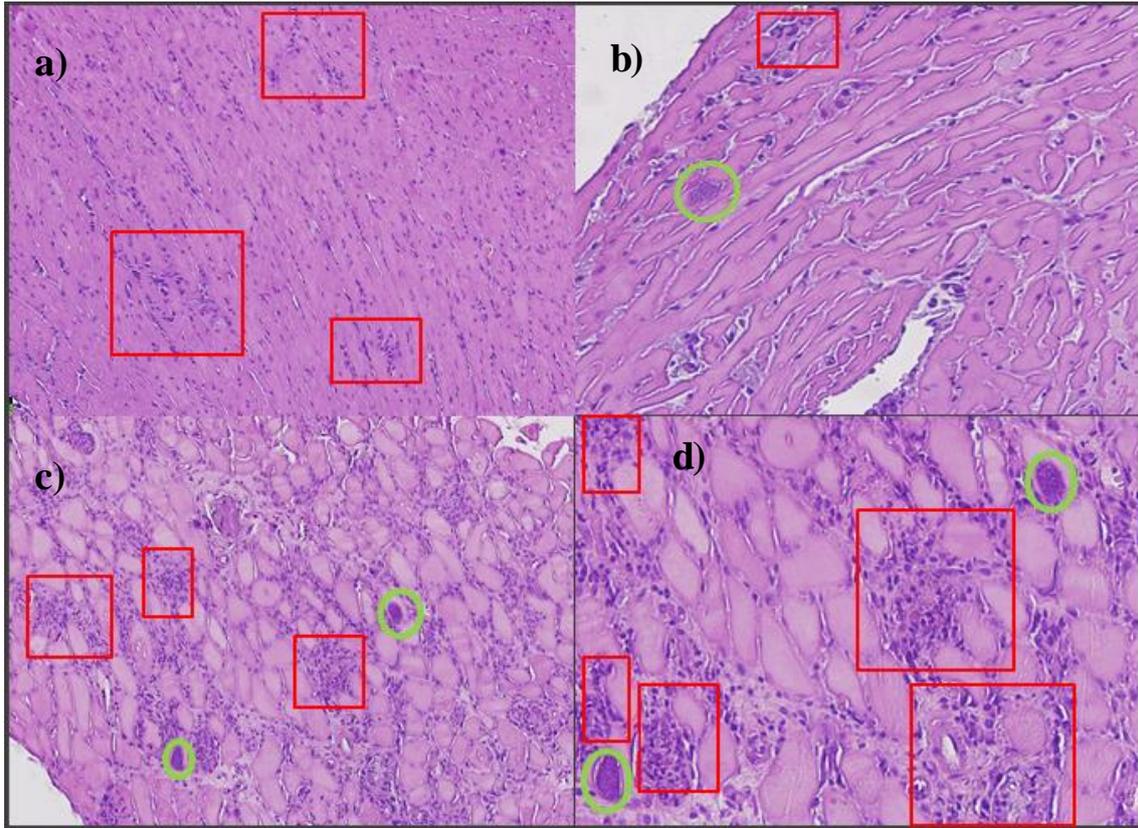


Figura 21: Secciones histológicas correspondientes al grupo 8 (SGO Z12+Lucky) a los 35 d.p.i. a) corazón, 20 X; b) corazón, 40 X; c) músculo esquelético, 20 X; d) músculo esquelético, 40 X. Infiltrados inflamatorios (□), nidos de amastigotes (○).

Para el grupo 9 (SGO Z12+Casibla) se observaron infiltrados inflamatorios leves en las muestras de corazón, con una superficie promedio de 1,21 % de la superficie total de la muestra; también se observaron nidos de amastigotes en estas muestras (Figura 22 a - b).

Las secciones del músculo esquelético del mismo grupo presentaron infiltrados inflamatorios moderados (Figura 22 c - d); el área cubierta por infiltrados en este caso fue en promedio de 8,10 %. Se encontraron numerosos nidos de amastigotes en las secciones de músculo esquelético.

Resultados

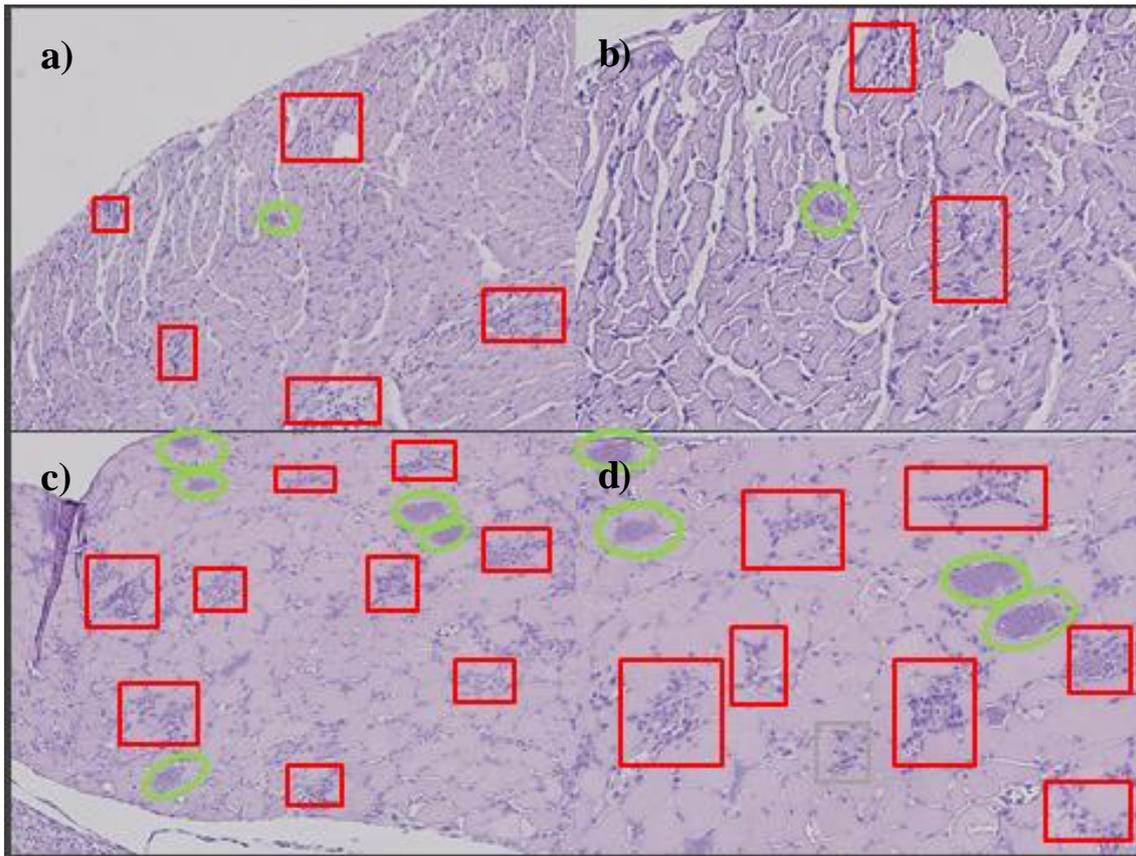


Figura 22: Secciones histológicas correspondientes al grupo 9 (SGO Z12+Casibla) a los 35 d.p.i. a) corazón, 20 X; b) corazón, 40 X; c) músculo esquelético, 20 X; d) músculo esquelético, 40 X. Infiltrados inflamatorios (\square), nidos de amastigotes (\circ).

Los infiltrados inflamatorios en las muestras de corazón del grupo 10 (Lucky+Casibla) presentaron una superficie promedio de 0,87 % del área total; se encontraron nidos de amastigotes en la mayoría de las muestras analizadas (Figura 23 a – b).

Las muestras de músculo esquelético presentaron infiltrados inflamatorios leves a severos, con una superficie promedio de 7,37 % de las áreas analizadas; varios nidos de amastigotes también se encontraron en todas las muestras de músculo esquelético (Figura 23 c – d).

Resultados

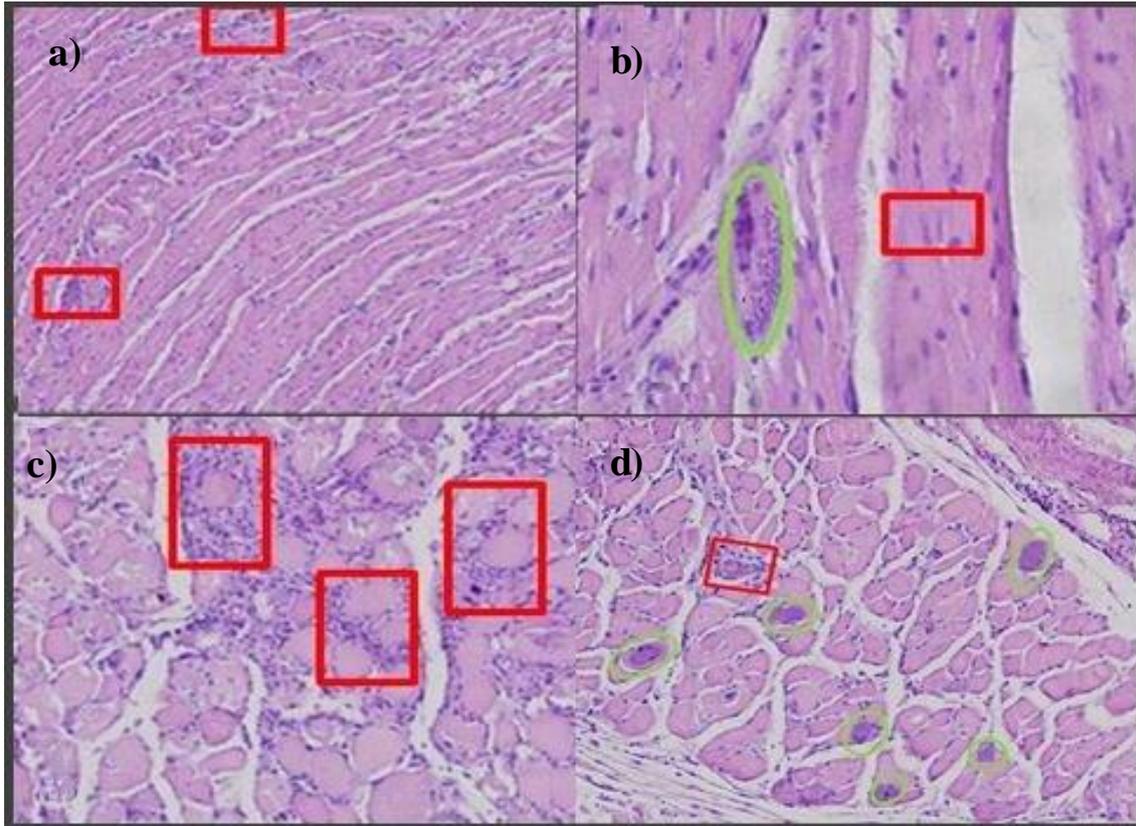


Figura 23: Secciones histológicas correspondientes al grupo 10 (Lucky+Casibla) a los 35 d.p.i. a) corazón, 20 X; b) corazón, 40 X; c) músculo esquelético, 20 X; d) músculo esquelético, 40 X. Infiltrados inflamatorios (□), nidos de amastigotes (○).

Al comparar las áreas cubiertas por infiltrados inflamatorios en corazón y en músculo esquelético, no se encontraron diferencias significativas entre los grupos estudiados (corazón vs corazón y músculo esquelético vs músculo esquelético), a excepción del área ocupada por infiltrados inflamatorios en músculo esquelético del grupo 2 al compararlo con los grupos 3, 4, 8 y 9 ($P < 0,05$).

Sí se encontraron diferencias significativas dentro de un mismo grupo, al comparar el porcentaje de infiltrados en corazón y en músculo esquelético en los 10 grupos analizados, siendo el área ocupada por infiltrados inflamatorios significativamente mayor en músculo esquelético ($P < 0,05$).

La Figura 24 muestra áreas representativas de músculo cardíaco y músculo esquelético de ratón sin infectar, que fueron tomadas como control.

Resultados

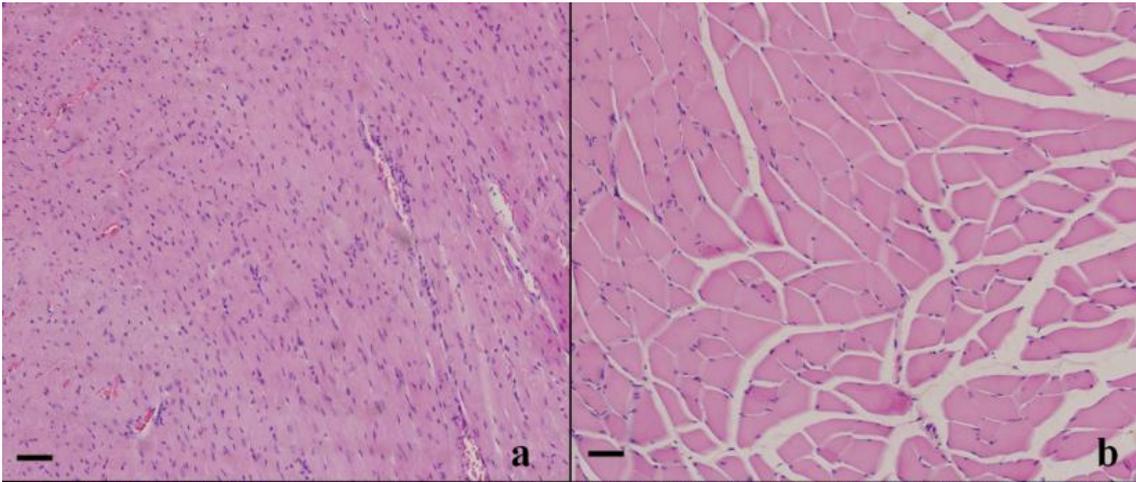


Figura 24: Secciones histológicas correspondientes a ratones no infectados. a) Corazón, 20 X; b) músculo esquelético, 20 X. (barra: 50 µm).

Detección de *T. cruzi* y tipificación molecular del linaje presente en cada órgano mediante PCR

La calidad del ADN de cada una de las muestras se verificó mediante la amplificación de un gen constitutivo del huésped (β -actina); las PCRs específicas para *T. cruzi* (utilizando los cebadores TCZ) se realizaron con el fin de verificar la presencia del parásito en sangre, corazón y músculo esquelético de los animales infectados con los distintos aislamientos/cepas de *T. cruzi*. Posteriormente, los parásitos presentes en cada muestra fueron caracterizados utilizando tres marcadores moleculares, como se describe en la figura 6. Estos resultados se resumen en la Tabla 6.

T. cruzi se encontró presente en todas las muestras correspondientes al momento de la infección estudiado (etapa aguda: 35 d.p.i.).

En cuanto a la tipificación molecular de los parásitos, la cepa utilizada para infectar el grupo 1 (Tulahuen) consistió solo en TcV, que se encontró presente en sangre, corazón y en músculo esquelético de cada individuo estudiado.

El aislamiento utilizado para infectar el grupo 2 (SGO Z12) consistió de una mezcla de UDTs (TcII y TcVI). La UDT TcII estuvo presente en sangre y corazón mientras que TcVI se encontró en las muestras de músculo esquelético de los 3 ratones analizados.

Resultados

El grupo 3 (Lucky) presentó solamente TcII tanto en sangre como en músculo esquelético y corazón en todos los individuos analizados.

El grupo 4 por su parte (Casibla), al igual que el grupo 2, mostró estar constituido por una mezcla de TcII y TcVI. De éstos, TcII se encontró siempre presente en sangre, mientras que la UDT TcVI estuvo presente en una muestra de corazón y en una de músculo esquelético.

Tabla 6: Detección y tipificación molecular de *Trypanosoma cruzi* en sangre, corazón y músculo esquelético, de ratones correspondientes a los grupos 1, 2, 3 y 4 durante la etapa aguda de la infección experimental.

Aislamiento		Ratón 1			Ratón 2			Ratón 3		
		S	C	ME	S	C	ME	S	C	ME
1. Tulahuen	TCZ	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	Mini-exón	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	24 S	110	110	110	110	110	110	110	110	110
	18 S	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Linaje de <i>T. cruzi</i>	TcV	TcV	TcV	TcV	TcV	TcV	TcV	TcV	TcV
2. SGO Z12	TCZ	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	Mini-exón	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	24 S	125	125	125	125	125	125	125	125	125
	18 S	+	+	-	+	+	-	+	+	-
	Linaje de <i>T. cruzi</i>	TcII	TcII	TcVI	TcII	TcII	TcVI	TcII	TcII	TcVI
3. Lucky	TCZ	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	Mini-exón	+	-	+	+	+	+	+	+	-
	24 S	125	130	125	125	125	125	125	125	130
	18 S	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	Linaje de <i>T. cruzi</i>	TcII	TcII	TcII	TcII	TcII	TcII	TcII	TcII	TcII
4. Casibla	TCZ	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	Mini-exón	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	24 S	125	125	125	125	125	125	125	125	125
	18 S	+	+	-	+	+	+	+	+	+
	Linaje de <i>T. cruzi</i>	TcII	TcII	TcVI	TcII	TcII	TcII	TcII	TcVI	TcII

S: sangre, C: corazón, ME: músculo esquelético. Tamaño de las bandas en pares de bases.

Resultados

Tabla 7: Detección y tipificación molecular de *Trypanosoma cruzi* en sangre, corazón y músculo esquelético, de ratones correspondientes a los grupos 5, 6, 7, 8, 9 y 10 durante la etapa aguda de la infección experimental.

Aislamiento		Ratón 1			Ratón 2			Ratón 3		
		S	C	ME	S	C	ME	S	C	ME
5. Tulahuen + SGO Z12	TCZ	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	Mini-exón	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	24 S	125	125	125	125	125	125	125	125	125
	18 S	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Linaje de <i>T. cruzi</i>	TcVI	TcVI	TcVI	TcVI	TcVI	TcVI	TcVI	TcVI	TcVI
6. Tulahuen + Lucky	TCZ	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	Mini-exón	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	24 S	125	125	125	125	125	125	125	125	125
	18 S	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	Linaje de <i>T. cruzi</i>	TcII	TcII	TcII	TcII	TcII	TcII	TcII	TcII	TcII
7. Tulahuen + Casibla	TCZ	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	Mini-exón	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	24 S	125	125	125	125	125	125	125	125	130
	18 S	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	Linaje de <i>T. cruzi</i>	TcII	TcII	TcII	TcII	TcII	TcII	TcII	TcII	TcII
8. SGO Z12 + Lucky	TCZ	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	Mini-exón	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	24 S	125	125	125	125	125	125	125	125	125
	18 S	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	Linaje de <i>T. cruzi</i>	TcII	TcII	TcII	TcII	TcII	TcII	TcII	TcII	TcII
9. SGO Z12 + Casibla	TCZ	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	Mini-exón	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	24 S	125	125	125	125	125	125	125	125	125
	18 S	+	+	+	+	+	-	+	+	+
	Linaje de <i>T. cruzi</i>	TcII	TcII	TcII	TcII	TcII	TcVI	TcII	TcII	TcII
10. Lucky + Casibla	TCZ	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	Mini-exón	+	+	-	+	+	+	+	+	+
	24 S	125	125	125	125	125	125	125	125	125
	18 S	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	Linaje de <i>T. cruzi</i>	TcII	TcII	TcII	TcII	TcII	TcII	TcII	TcII	TcII

S: sangre, C: corazón, ME: músculo esquelético. Tamaño de las bandas en pares de bases.

Resultados

Como puede observarse en la tabla 7, en el grupo 5 (Tulahuen+SGO Z12) se observó la UDT TcVI tanto en sangre como en las muestras de corazón y músculo esquelético. La UDT TcV por su parte no se encontró en ninguna de las muestras analizadas.

Los grupos 6, 7, 8, 9 y 10, presentaron la UDT TcII tanto en sangre como en corazón y músculo esquelético de los 3 ratones estudiados. Sólo en el grupo 9 se encontró la UDT TcVI en una muestra de músculo esquelético.

Análisis de la distribución del parásito en los diferentes tejidos por enzimas de restricción

Para estudiar más profundamente la variabilidad de *T. cruzi* en los tejidos del huésped (sangre, corazón y músculo esquelético), se realizó el análisis de los fragmentos producidos luego de la digestión con enzimas de restricción (RFLP) del fragmento del mini-exón (300 pb) amplificado anteriormente. Se utilizaron cinco enzimas con sitios de restricción teóricos en dicho fragmento: Bce AI, Dra III, Fsp I, Rsa I y Bsm AI. De éstas, Bce AI y Bsm AI presentaron sitios de corte en el fragmento amplificado proveniente de los diferentes tejidos de los tres grupos estudiados; Dra III, Fsp I y Rsa I por otro lado, no presentaron sitios de corte en ninguno de los casos.

Bce AI demostró ser más eficaz en la diferenciación de las subpoblaciones de parásitos presentes en cada muestra, ya que presentó sitios de restricción variables en las diferentes muestras de tejido de los tres grupos, mientras que Bsm AI presentó dos sitios de corte en todos los casos, generando cuatro fragmentos: un sitio fue de 200 pb y otro de 100 pb; y el segundo sitio de corte fue a 250 pb y 100 pb.

Las tablas 8 y 9 muestran los resultados obtenidos de la digestión con Bce AI del fragmento del mini-exón amplificado en los diferentes tejidos de cada grupo, durante la etapa aguda de la infección experimental (35 d.p.i).

Los ratones del grupo 1 (Tulahuen) no presentaron variaciones en los sitios de restricción del fragmento del mini-exón proveniente de los tejidos analizados, lo que indica la presencia de una sola población de parásitos en dichos tejidos (todos correspondientes a la UDT TcV como se observó anteriormente –tabla 6). Todos los sitios de restricción del fragmento del mini-exón proveniente de las muestras de sangre, corazón y músculo esquelético fueron

Resultados

comparables en los tres ratones estudiados, revelando que los parásitos fueron similares en los tres casos.

Dentro de las muestras del grupo 2 (SGO Z12), el patrón de digestión del fragmento del mini-exón proveniente de las tres muestras de músculo esquelético fue diferente al presentado por las muestras de sangre y corazón del mismo animal (que fueron similares entre sí), confirmando la presencia de una subpoblación diferente de *T. cruzi*. Como se recordará de los resultados de la tipificación molecular de los parásitos, el linaje TcVI se encontró presente en estas muestras de músculo esquelético.

Como puede observarse en la tabla 8, en el grupo 3 (Lucky) se observó el mismo patrón de bandas para las tres muestras de sangre, corazón y músculo esquelético lo que indica la presencia de una sola población de parásitos en dichos tejidos.

Como se observó anteriormente, dentro de las muestras del grupo 4 (Casibla), el linaje predominante fue TcII (aunque TcVI estaba presente en algunas de las muestras de tejido muscular). Los fragmentos de restricción en este caso muestran una subpoblación de parásitos diferente en una muestra de músculo esquelético y en una muestra de corazón, subpoblaciones que serían similares entre sí, pero diferentes a las presentes en circulación del mismo animal.

Los ratones del grupo 5 (tabla 9) presentaron un patrón de restricción similar al presentado por las muestras de músculo esquelético del grupo 2. Las muestras de los grupos 6, 7, 8, 9 y 10 mostraron un patrón de restricción similar entre ellas y no se encontraron variaciones en los sitios de corte presentes en el fragmento del mini-exón amplificado.

Resultados

Tabla 8: Representación esquemática del perfil de bandas obtenido luego de la digestión con Bce AI del fragmento del mini-exón amplificado en los diferentes tejidos de los grupos 1, 2, 3 y 4 a los 35 días post infección.

Grupos	pb	Ratón 1			Ratón 2			Ratón 3		
		S	C	ME	S	C	ME	S	C	ME
1. Tulahuen	300	████	████	████	████	████	████	████	████	████
	250									
	200									
	150									
	100									
	50									
2. SGO Z12	300									
	250			████			████			████
	200	████	████		████	████		████	████	
	150			████			████			████
	100	████	████		████	████		████	████	
	50									
3. Lucky	300									
	250									
	200	████	████	████	████	████	████	████	████	████
	150									
	100	████	████	████	████	████	████	████	████	████
	50									
4. Casibla	300									
	250			████					████	
	200	████	████		████	████	████	████		████
	150			████					████	
	100	████	████		████	████	████	████		████
	50									

S: sangre, C: corazón, ME: músculo esquelético. pb: pares de bases.

Resultados

Tabla 9: Representación esquemática del perfil de bandas obtenido luego de la digestión con Bce AI del fragmento del mini-exón amplificado en los diferentes tejidos de los grupos 5, 6, 7, 8, 9 y 10 a los 35 días post infección.

Grupos	pb	Ratón 1			Ratón 2			Ratón 3		
		S	C	ME	S	C	ME	S	C	ME
5. Tulahuen +SGO Z12	300									
	250	■	■	■	■	■	■	■	■	■
	200									
	150	■	■	■	■	■	■	■	■	■
	100									
	50									
6. Tulahuen +Lucky	300									
	250									
	200	■	■	■	■	■	■	■	■	■
	150									
	100	■	■	■	■	■	■	■	■	■
	50									
7. Tulahuen +Casibla	300									
	250									
	200	■	■	■	■	■	■	■	■	■
	150									
	100	■	■	■	■	■	■	■	■	■
	50									
8. SGO Z12 +Lucky	300									
	250									
	200	■	■	■	■	■	■	■	■	■
	150									
	100	■	■	■	■	■	■	■	■	■
	50									
9. SGO Z12 +Casibla	300									
	250						■			
	200	■	■	■	■	■		■	■	■
	150						■			
	100	■	■	■	■	■		■	■	■
	50									
10. Lucky +Casibla	300									
	250									
	200	■	■	■	■	■	■	■	■	■
	150									
	100	■	■	■	■	■	■	■	■	■
	50									

S: sangre, C: corazón, ME: músculo esquelético.

DISCUSIÓN

La enfermedad de Chagas es una afección compleja de difícil erradicación y cuyo tratamiento no es completamente eficaz. Esto se debe a varios factores, entre ellos: la amplia variedad de especies de mamíferos silvestres y domésticos que actúan como reservorios de *T. cruzi* (Storino y Milei, 1994), la diversidad de insectos triatomínicos involucrados en la transmisión del mismo (OMS, 2007), la diversidad de manifestaciones clínicas de la enfermedad y la resistencia del parásito a los tratamientos disponibles.

En los últimos años se han logrado grandes avances en las técnicas utilizadas para el análisis de la variabilidad de *T. cruzi*, que han permitido asociar los distintos linajes con la distribución geográfica, con las especies de triatomínicos vectores y con sus respectivos reservorios. El parásito comprende una población heterogénea que muestra propagación clonal; se ha observado también intercambio genético y de recombinación en estudios *in vitro* y en la naturaleza (Gaunt y col., 2003; Westenberger y col., 2005).

Debido a que el hombre se convirtió en un reciente reservorio en la historia evolutiva del parásito, es esperable que diferentes poblaciones parasitarias posean diversas tasas de infectividad y virulencia, así como también, diferentes capacidades para desarrollar la enfermedad en el hombre (Martínez y Espinoza, 2012). La existencia de poblaciones parasitarias heterogéneas y de una enfermedad con diferentes manifestaciones clínicas permite pensar en una relación entre ambas características que aún no está completamente definida (Macedo y col., 1998).

Para establecer una relación entre las manifestaciones clínicas de la enfermedad de Chagas con los linajes parasitarios se requieren estudios complejos de realizar, debido a que es importante confirmar que la presencia del parásito sea la responsable del desencadenamiento de los síntomas característicos de la enfermedad. Además los aislamientos de *T. cruzi* pueden estar compuestos por varios linajes, y algunos de ellos no ser detectados si circulan en sangre con baja carga parasitaria (Vago y col., 2000; Câmara y col., 2010).

En América Latina se reconocen diferencias regionales en la forma de manifestación de la enfermedad de Chagas, las cuales han sido reportadas desde hace varios años por diferentes grupos de investigación (Bakos, 1988; Atias, 1995). Actualmente se reconoce que las formas digestivas de la enfermedad son raramente detectadas al norte del Ecuador (Colombia, Venezuela y países centroamericanos) y que la cardiopatía chagásica crónica es más grave en Argentina y en Brasil, que en el resto de los países sudamericanos y centroamericanos. Dentro

Discusión

de Brasil, la enfermedad de Chagas presenta mayor morbilidad en el Estado de Minas Gerais que en el resto del país. En Bolivia, aunque la cardiopatía chagásica es uniforme, la esofagopatía predomina en las regiones más bajas del país y la colonopatía predomina en el altiplano (Pinto Dias, 2000). En Colombia, la enfermedad de Chagas constituye una de las mayores causas de incapacidad en la población económicamente activa. Un estudio reciente sobre la morbilidad de la enfermedad en individuos que habitan regiones endémicas, mostró que cerca del 20 % de los pacientes diagnosticados, que presentan serología positiva para *T. cruzi*, presentaron también la patología, principalmente relacionada con la afección cardíaca (Beltrán y col., 2001). Argentina comparte una de las zonas de mayor prevalencia de infectados: la región que involucra Bolivia y el Gran Chaco en Argentina es conocida como la zona de “hiperendemia”. La principal afección aquí es la miocardiopatía chagásica, manifestándose en distintas formas: bloqueos divisionales del haz de His y aurículo-ventriculares, taquiarritmias, bradiarritmias, insuficiencia cardíaca, accidente cerebrovascular isquémico embólico, debidos a la miocardiopatía propiamente dicha que se desarrolla en el 20 al 30 % de los individuos infectados. Se estima que la enfermedad provocaría entre 45.000 y 50.000 muertes anuales, de las cuales el 60 % acaecen en forma súbita (Mordini y col., 2016). Estas variaciones geográficas en la prevalencia de las diferentes formas clínicas de la enfermedad son probablemente debido tanto a la variación genética de *T. cruzi* como a las características genéticas y ambientales del hospedador (Macedo y Pena, 1998; Macedo y col., 2004).

En el presente trabajo, con el objetivo de profundizar los conocimientos sobre la importancia de la composición genética del aislamiento de *T. cruzi* que infecta al huésped y/o su tropismo diferencial a los tejidos del huésped, se evaluó la presencia y distribución de 3 aislamientos naturales y una cepa del parásito en distintos tejidos (sangre, músculo cardíaco y músculo esquelético) de ratones infectados con cada aislamiento por separado y con combinaciones de ellos, durante la fase aguda de la infección experimental.

Varios estudios han indagado sobre las propiedades biológicas y los comportamientos de las diferentes UDTs por separado (Aquilino y col., 2012; Ragone y col., 2012; Silva Valadares y col., 2012), pero pocos se han centrado en la utilización de aislamientos compuestos por una mezcla de UDTs diferentes (Llewellyn y col., 2011), tal como el presente. En los casos en los que se ha estudiado la infección debida a diferentes UDTs en un mismo individuo, las mismas han sido “generadas experimentalmente” mediante la infección de animales con dos cepas de parásitos correspondientes a UDTs diferentes y solo se determinaron los tipos de parásitos

Discusión

presentes en circulación (Ragone y col., 2015). En este caso, se utilizaron aislamientos naturales de *T. cruzi* (formados por más de un linaje) que actualmente se encuentran circulando en áreas endémicas de nuestro país, lo que permite analizar el comportamiento de los mismos una vez que ingresan al huésped mamífero.

En las diferentes muestras, la presencia del parásito fue verificada a través de la medición de la parasitemia, estudios histológicos y PCR específica para *T. cruzi*. En la etapa aguda de la infección experimental (35 d.p.i.), tanto en los grupos infectados con un solo aislamiento como en los grupos infectados con una mezcla de dos de ellos, se encontró que el parásito estaba presente en sangre, en corazón y en músculo esquelético. La presencia de parásitos en corazón (determinada mediante PCR y en algunos casos mediante la observación de nidos de amastigotes) confirma el cardiotropismo de *T. cruzi* y nos permite postular que algunos aislamientos del parásito pueden evadir las defensas del tejido cardíaco, propuestas por algunos autores como protectoras de este órgano (Arguello, 2012). La presencia de parásitos en los cortes de músculo esquelético por otro lado, confirma la importancia de este órgano como reservorio de parásitos.

La parasitemia fue positiva en los 10 grupos analizados, negativizándose a partir de los 42 d.p.i. en la mayoría de los casos. Los grupos infectados con la combinación de dos aislamientos presentaron un pico de parásitos en circulación antes que los grupos infectados con un solo aislamiento y se observaron parásitos en circulación durante un período más prolongado de tiempo; esto es esperable ya que estos grupos fueron inoculados inicialmente con el doble de la cantidad de parásitos que los grupos infectados con un solo aislamiento (100 vs 50 tripomastigotes, respectivamente). La cantidad total de parásitos en circulación para estos grupos sin embargo, en general fue intermedia entre las curvas de los grupos que fueron infectados con un solo aislamiento. No obstante, en algunos casos, esta mayor cantidad inicial de parásitos impactó en la sobrevivencia de los ratones, que fue significativamente menor que en los grupos con las infecciones simples correspondientes.

La medición de la parasitemia mediante observación directa (cámara de Neubauer) pierde sensibilidad después de la etapa aguda de la enfermedad. Mientras que en la etapa aguda encontrar al parásito no presenta problemas debido a la elevada parasitemia, en la etapa crónica (en todas sus formas), el diagnóstico parasitológico es más complejo y requiere de varias pruebas de laboratorio para su confirmación (Guhl y col., 2002; OMS, 2002). Debido a esto, el diagnóstico de esta patología depende de la etapa de la enfermedad en la que se encuentre el paciente y se debe apoyar en la información tanto epidemiológica como clínica,

Discusión

así como en las pruebas de laboratorio. La PCR se basa en la detección directa del ADN del parásito y presenta la ventaja de no depender del estado inmunológico del paciente ni del tiempo de adquisición de la infección (Wincker y col., 1994; Vallejo, 1998).

Desde la década pasada, la aplicación de la PCR para detectar a *T. cruzi* directamente en muestras de sangre y tejidos ha abierto nuevas posibilidades para el diagnóstico de la infección y la evaluación de la quimioterapia tripanocida en diferentes entornos clínicos y epidemiológicos (Moser y col., 1989; Marcet y col., 2006; Duffy y col., 2009). La presencia de *T. cruzi* en los tejidos del huésped desde los primeros momentos de la infección (que en el presente trabajo fue determinada mediante PCR y los parásitos fueron a su vez visualizados a través de los estudios histológicos) seguramente influye en la evolución de la infección y reafirma la importancia de un tratamiento específico, para eliminar el parásito desde esta etapa. Teniendo en cuenta estos resultados, un enfoque pertinente para ello sería el tratamiento etiológico con moléculas portadoras, que se unan a benznidazol o a cualquier otra droga tripanocida, y la lleve al interior de los tejidos (donde se encuentran los parásitos), mejorando la solubilidad y la especificidad hacia el parásito (Silva y col., 2008; Buckner y Navabi, 2010).

Varios estudios han confirmado la alta incidencia de infecciones múltiples en pacientes y vectores (Bosseno y col., 2000; Solari y col., 2001; Mantilla y col., 2010). Infecciones mixtas con parásitos correspondientes a UDTs diferentes en un mismo paciente han sido reportadas (Mantilla y col., 2010; Ramírez y col., 2010). Los tres aislamientos naturales utilizados en el presente estudio consistieron de una mezcla de diferentes linajes de *T. cruzi*, como se determinó mediante los estudios de tipificación molecular; por lo tanto son ejemplos de infecciones mixtas en pacientes y vectores, ya que dos de ellos se obtuvieron de niños infectados con Chagas congénito y el tercero a partir de un insecto vector proveniente de área endémica. Su utilización en un modelo experimental de infección ha demostrado que los "tipos" diferentes de parásitos podrían presentar un tropismo preferencial para ciertos órganos o tejidos y extenderse por todo el huésped, empeorando la situación para las estrategias de tratamiento. El propósito de incluir los grupos compuestos de infecciones mixtas, residió en el hecho de que la distribución de *T. cruzi* puede verse modificada por la presencia de una mayor cantidad de parásitos y/o por linajes o poblaciones diferentes, presentes en cada uno de los aislamientos por separado.

Como se mencionó anteriormente, la técnica de PCR, por su sensibilidad, permite identificar el parásito directamente en las muestras de tejidos; en este caso para su detección se amplificó

Discusión

un fragmento correspondiente al ADN del núcleo del parásito (TCZ –Virreira y col., 2003) que ha demostrado alta sensibilidad y especificidad para *T. cruzi* (Velázquez y col., 2014). Para la identificación de los linajes y las posibles subpoblaciones se utilizó el gen del mini-exón (Brisse y col., 2001). Este gen constitutivo ha demostrado ser de gran valor en la investigación de la diversidad genética del parásito ya que posee regiones intergénicas divergentes (Fernández y col., 1998; Brisse y col., 2001).

En los resultados obtenidos se observa que los parásitos presentes, tanto en circulación como en las muestras de corazón y músculo esquelético de los animales pertenecientes al grupo 1, corresponden al linaje TcV. Esto es esperable, ya que los mismos fueron infectados con la cepa Tulahuen; al ser una cepa, como se mencionó anteriormente, se supone presenta mayor homogeneidad en los parásitos que la componen y todos ellos presentan así características similares. Esta homogeneidad fue confirmada por el RFLP en los diferentes tejidos, que mostró patrones de restricción similares en todos los casos (tanto en los diferentes tejidos analizados, como en los distintos animales infectados con esta cepa). La presencia del linaje TcV en las muestras de corazón de este grupo produjo infiltrados inflamatorios muy leves, mientras que en las muestras de músculo esquelético los mismos fueron moderados; en todos los casos, se observó la presencia del parásito en el análisis microscópico. Estudios epidemiológicos llevados a cabo en nuestro país han demostrado que TcV es uno de los linajes más prevalentes en humanos (Diosque y col., 2003; Burgos y col., 2007; Cardinal y col., 2008; Corrales y col., 2009; Diez y col., 2010), lo que subraya la importancia del estudio de su distribución en modelos experimentales de infección.

El aislamiento SGO Z12 (con el cual se infectó al grupo 2) mostró estar formado por una mezcla de parásitos correspondientes a los linajes TcII y TcVI. Su distribución en los distintos tejidos del huésped no fue homogénea: el linaje TcII estuvo presente en circulación y en las muestras de corazón de los animales de este grupo mientras que el linaje TcVI se encontró en las muestras de músculo esquelético. Es importante destacar sin embargo, que la metodología utilizada para determinar los linajes presentes en cada muestra está basada, en algunos casos, en la ausencia en lugar de la presencia de productos de PCR, lo que puede ser problemático (Zingales y col., 2012) o enmascarar la presencia de infecciones mixtas en una misma muestra. Particularmente, aquellas muestras que presenten tanto el linaje TcII como el linaje TcVI, con esta metodología mostrarán solamente la presencia de TcII, ya que TcVI se basa en la ausencia de una banda que en TcII sí está presente (figura 4). Por esta razón, algunos autores han propuesto metodologías alternativas para la tipificación de los linajes presentes

Discusión

(Cosentino y Agüero, 2012); ninguna de ellas sin embargo es totalmente eficaz a la hora de detectar infecciones mixtas en una misma muestra (es decir, que en una misma muestra se encuentren parásitos de diferentes linajes) ya que en todos los casos algunos linajes pueden quedar encubiertos. La utilización de dos metodologías diferentes, que alternativamente muestren la presencia de distintos linajes, puede permitir discriminar más detalladamente los linajes presentes en una determinada muestra (Lo Presti y col., 2014). Por esta razón, algunas de las muestras utilizadas en el presente trabajo fueron caracterizadas con un segundo método de tipificación (resultados no mostrados) que demostró la presencia de TcVI en las muestras de sangre y músculo cardíaco del grupo 2. Estos resultados demuestran que linajes diferentes pueden efectivamente estar presentes en los distintos tejidos de un mismo huésped (en este caso en circulación y en el tejido cardíaco). Diferencias en los parásitos encontrados en diferentes órganos de un mismo huésped han sido descritas anteriormente en pacientes (sangre *vs* tejido cardíaco) (Macedo y col., 2004; Manoel-Caetano y Silva, 2007) y en modelos experimentales (Mejía y Triana, 2005), aunque en ninguno de estos casos se analizó el linaje al que pertenecían los mismos. Al aplicar esta segunda metodología de tipificación, las muestras de músculo esquelético sólo mostraron el linaje TcVI, como se había encontrado anteriormente. Los patrones de digestión obtenidos en este grupo confirman la presencia de una subpoblación de parásitos diferente en el músculo esquelético de estos animales (al compararlas con las subpoblaciones presentes en sangre y corazón, en las que los patrones de dispersión fueron similares entre sí). Los infiltrados inflamatorios encontrados en músculo esquelético en estos animales fueron muy leves (con un promedio de área cubierta por los mismos de 1,86 %), significativamente menores que los encontrados en la mayoría de los casos en los que dos linajes (TcII y TcVI) estaban presentes en estos tejidos (grupos 3 y 4). En un trabajo similar (Siffo, 2014), en el cual se utilizó la cepa RA (TcVI) para la infección de un modelo murino, se encontraron nidos de amastigotes en el tejido muscular cardíaco, no así en el esquelético. En los presentes resultados, no se observaron nidos de amastigotes en ninguno de los tejidos analizados; estas diferencias pueden deberse a la utilización de una cepa pura perteneciente al linaje TcVI (RA) *vs* la utilización de un aislamiento (SGO Z12) en el cual la presencia de otro linaje puede afectar la distribución de los parásitos en los distintos órganos del individuo infectado.

La presencia de subpoblaciones diferentes en los tejidos (músculo esquelético en este caso) a las presentes en sangre podría explicar los resultados contradictorios en la respuesta a los tratamientos parasitarios o aún la falta de efectividad de los mismos: mientras algunas

Discusión

cepas/aislamientos presentan cierta susceptibilidad a las drogas administradas, otras son más resistentes y pueden permanecer en los órganos del hospedador aún después de los tratamientos. Varios autores han demostrado la diferente susceptibilidad/resistencia de las cepas o aislamientos de *T. cruzi* a los tratamientos habituales (Filardi y Brener, 1987; Toledo y col., 2003; Martins y col., 2007; Caldas y col., 2008), factor que será más relevante si estas diferencias están presentes en un mismo individuo infectado, según lo encontrado en el presente estudio, o incluso dentro de un tejido particular del mismo individuo. El estudio BENEFIT (Benznidazole Evaluation for Interrupting Trypanosomiasis) es un ensayo clínico aleatorizado y controlado con placebo a gran escala que se realizó para evaluar los efectos del tratamiento etiológico con benznidazol en pacientes chagásicos crónicos (Marín-Neto y col., 2008). Sus resultados por ejemplo, han demostrado que las tasas de conversión de la PCR (de positivas a negativas luego del tratamiento) resultaron variables de acuerdo a la ubicación geográfica, resaltando nuevamente el papel de la variabilidad genética del parásito y su susceptibilidad diferencial al tratamiento (Morillo y col., 2015).

Los aislamientos utilizados para la infección de los grupos 3 y 4 (Lucky y Casibla respectivamente) también están formados por una mezcla de los linajes TcII y TcVI. En el presente trabajo, la mayoría de las muestras correspondientes a los ratones infectados con estos aislamientos presentaron el linaje TcII; sin embargo, al aplicar el segundo método de tipificación, TcVI también se encontró presente en estas muestras (resultados no mostrados), evidenciando nuevamente la coexistencia de linajes en un mismo tejido del huésped. Los patrones de restricción fueron similares para sangre, corazón y músculo esquelético de los animales correspondientes al grupo 3 (Lucky), coincidiendo con la presencia de los dos linajes en todos los casos; en el grupo 4 (Casibla) sin embargo, las muestras en las que sólo se detectó TcVI (una muestra de corazón y una de músculo esquelético) mostraron un patrón diferente al de las muestras en las que ambos linajes estaban presentes, coincidiendo con el patrón presentado por las muestras con TcVI del grupo 2. Cabe destacar que los infiltrados inflamatorios encontrados tanto en corazón como en músculo esquelético de los individuos infectados con estos aislamientos fueron los más abundantes (alrededor de un 3 % para corazón y un 12 % para músculo esquelético).

La presencia de TcII y TcVI en los tres aislamientos utilizados en el presente estudio refleja el hecho de que éstos son dos de los linajes de *T. cruzi* (junto a TcV, como se mencionó anteriormente) más frecuentemente asociados al ciclo domiciliario de infección en el cono sur (Cardinal y col., 2008; Marcet y col., 2006; Risso y col., 2011; Cura y col., 2012).

Discusión

Las muestras de sangre, corazón y músculo esquelético de los ratones del grupo 5, infectados con una mezcla de la cepa Tulahuen y el aislamiento SGO Z12, presentaron solo el linaje TcVI en todos los casos. Sorprendentemente, TcII y TcV no se encontraron presentes en ningún caso, a pesar de estar presentes en el aislamiento SGO Z12 y en la cepa Tulahuen, respectivamente. Los patrones de restricción encontrados confirman la presencia de TcVI, ya que en todos los casos (sangre, corazón y músculo esquelético) fueron similares a los patrones encontrados en las muestras en las que solo TcVI estaba presente (músculo esquelético de los ratones del grupo 2 por ejemplo). Los infiltrados inflamatorios en corazón fueron muy leves y no se detectó la presencia de nidos de amastigotes; en músculo esquelético por su parte, los infiltrados inflamatorios fueron de leves a moderados (severos en algunos casos) y presentaron nidos de amastigotes en los tres casos analizados.

Es importante destacar que el grupo 5 se encuentra infectado con tres linajes (TcII, TcV y TcVI); sin embargo, solo uno de ellos fue detectado en todos los casos (TcVI). Estos resultados concuerdan con lo encontrado por Ragone y colaboradores (2015) en un modelo de coinfección, en el que “mezclaron experimentalmente” parásitos de diferentes linajes y los utilizaron para la inoculación de ratones C57BL/6. En estos animales luego estudiaron la distribución de los diferentes linajes en sangre, corazón y músculo esquelético, encontrando que cuando los animales eran coinfectados con TcV y otro linaje (TcIII o TcVI), el ADN de TcV no era detectado en ninguno de los tejidos analizados (sólo se detectaba el ADN correspondiente al otro linaje coinfectante: TcIII o TcVI) y en todos los casos sólo se detectaba uno de los linajes utilizados (a pesar de que los animales habían sido infectados con dos de ellos). Este resultado puede deberse a varios factores: la supervivencia de un tipo determinado de parásito en la sangre periférica puede estar relacionada con diferentes mecanismos asociados con su capacidad para escapar del sistema inmune del huésped (Sales-Campos y col., 2014; Ragone y col. 2015), o debido a un proceso selectivo dentro de las células del huésped en favor de un linaje determinado (Pena y col., 2011). En este caso, los autores reportan que TcIII y TcVI inducirían una mayor respuesta serológica que TcV (Ragone y col., 2012); en consecuencia, en un evento de infección mixta entre TcV + (TcIII o TcVI), TcV puede ser afectado por la respuesta inmunológica inducida por TcIII o TcVI y ser eliminado del huésped (por lo menos a niveles no detectables por las técnicas utilizadas). Algo similar podría estar ocurriendo con TcII en las muestras del grupo 5: el sistema inmunológico del huésped podría estar eliminando los parásitos TcII y TcV a niveles no detectables por las metodologías utilizadas en el presente trabajo y solo TcVI sería detectado

Discusión

en estas muestras (aquí cabe destacar que tanto TcII como TcV pueden ser detectados con la metodología propuesta y no quedarían encubiertos por otro linaje, si estuvieran presentes). En todas las coinfecciones estudiadas por Ragone y colaboradores, TcVI también fue el único linaje detectado sobre TcIII y TcV (coinfección con TcII no fueron estudiadas en ese caso) (Ragone y col., 2015). Los parásitos TcII y TcV también podrían estar alojados en otros tejidos del huésped que no fueron estudiados en el presente trabajo. Resultados previos de nuestro laboratorio han demostrado que hígado y bazo son dos órganos altamente parasitados, y que los parásitos allí presentes pueden ser diferentes (aún de una UDT diferente) a los presentes en circulación (Lo Presti y col., 2014). Otros órganos como cerebro, pulmón y riñón pueden representar reservorios de parásitos con probables subpoblaciones diferentes (Carvalho y col., 1997; Ramirez y col., 2007; Rodriguez y col., 2009; Cohen y col., 2010; Menghi y col., 2011; Del Valle y col., 2014).

En los grupos 6, 7, 8, 9 y 10, que fueron infectados con el resto de las combinaciones de cepas/aislamientos, se observó la presencia del linaje TcII en la mayoría de los casos. Sin embargo, no puede descartarse la presencia del linaje TcVI ya que, como se mencionó anteriormente, puede no detectarse mediante la metodología de tipificación planteada. En todos los casos en los que se aplicó la segunda metodología de tipificación (resultados no mostrados), este linaje se encontró presente, junto a TcII. Además, en todas las muestras provenientes de estos grupos (6-10), los patrones de restricción coincidieron y fueron similares a los presentados por las muestras en las que TcII y TcVI se encontraron presentes, lo que sugiere que TcVI también estaría presente en estas muestras, en coinfección con TcII. Sólo una muestra de músculo esquelético de un ratón del grupo 9 (SGO Z12+Casibla) presentó un patrón de restricción diferente, coincidiendo con la presencia de sólo TcVI en esta muestra (y con un patrón de restricción similar al presentado por las muestras TcVI).

Los grupos 6 y 7 también fueron infectados con tres linajes (al igual que el grupo 5); sin embargo, en este caso, dos de ellos se encontraron presentes en la mayoría de los casos. Nuevamente, TcV no fue encontrado en ninguna de las muestras provenientes de estos grupos, sugiriendo nuevamente que este linaje sería más susceptible que TcVI a la respuesta inmunológica del huésped. Adicionalmente, TcII parecería presentar mayor resistencia a la respuesta inmune que TcV, ya que se encontró presente en todas las muestras analizadas. Por lo tanto, los parásitos TcII presentes en los aislamientos Lucky y Casibla serían menos susceptibles que los parásitos TcII presentes en SGO Z12, que no fueron detectados en la coinfección con Tulahuen. En este sentido, siempre que los aislamientos Lucky o Casibla

Discusión

formaron parte de la infección (ya sea en infección simple o en coinfección con otra cepa/aislamiento), ambos linajes, TcII y TcVI, fueron encontrados en la mayoría de las muestras. Es importante destacar que TcII se encontró siempre asociado a TcVI (es decir, que no hubo muestras que sólo presenten TcII, mientras que sí se encontraron muestras con sólo TcVI, como se describió anteriormente).

A diferencia de lo que cabría esperar, aquellos grupos infectados con solo una cepa/aislamiento presentaron mayor variabilidad en la distribución de los parásitos que aquellos grupos infectados con combinaciones de cepas/aislamientos (tabla 8 y tabla 9). Esto sugiere que el tropismo de los diferentes tipos de parásitos hacia los tejidos se podría ver influenciado por la presencia de una mayor cantidad de subpoblaciones de parásitos o por interacciones parásito/parásito de diferentes linajes. En este sentido, mecanismos de exclusión competitiva han sido descritos para otros parásitos, en los que cepas/especies similares pueden infectar un mismo huésped y alojarse en diferentes tejidos (como por ejemplo en la filiarisis – Molyneux y col., 2014) o competir hasta que una de las poblaciones es eliminada (en malaria –Richie, 1988; Abkallo y col., 2015). Esta interacción entre los parásitos de diferentes subpoblaciones también se ve reflejada en el hecho de que sólo se encontró la presencia de uno o dos linajes en cada uno de los animales infectados con tres de ellos (cuando la presencia de los tres linajes hubiera sido lo esperado). Como se discutió anteriormente, el linaje “ausente” podría encontrarse en otros tejidos no analizados en el presente trabajo o haberse perdido por interacciones parásito/parásito o parásito/huésped. Así, una mayor diversidad de parásitos dispararía una respuesta inmune “más variada” que haría que aquellos parásitos más susceptibles queden restringidos a ciertos órganos o sean eliminados del huésped. Los resultados obtenidos sugieren que cualquier población particular de *T. cruzi* podría infectar diferentes tejidos y su presencia en un órgano particular estaría determinada por los otros parásitos presentes en la coinfección (en el caso de infecciones con diferentes linajes) y por complejas interacciones huésped/parásito. Nuevos estudios son necesarios para aclarar estas interacciones y la importancia del tropismo tisular en el desarrollo de la infección.

Los resultados obtenidos resaltan la necesidad de realizar estudios basados en la utilización tanto de muestras de tejido como muestras de sangre de los individuos infectados y comparar los genotipos de *T. cruzi* presentes en un mismo individuo (Ramírez y col., 2010), ya que, como se ha demostrado, pueden ser muy diferentes dependiendo del tipo y de la composición de los parásitos infectantes, lo que podría influir en el curso clínico y posible tratamiento de la patología. Como se mencionó anteriormente, se ha demostrado la presencia de diferentes

Discusión

poblaciones de *T. cruzi* en la sangre y en el tejido cardíaco de individuos infectados (Burgos y col., 2010; Lo Presti y col., 2014), sugiriendo que los genotipos de *T. cruzi* que causan el daño celular son diferentes a los que se encuentran en sangre (Guhl, 2013), ratificando la posibilidad de utilización de tratamientos combinados, con fármacos con diferentes mecanismos de acción y con diferentes especificidades respecto a las cepas/aislamientos de parásitos (Rivarola y Paglini-Oliva, 2011; Strauss y col., 2013).

Es importante considerar que dentro de cada una de las UDTs, los aislamientos que comparten los perfiles para determinados marcadores moleculares no son necesariamente idénticos genéticamente, y con frecuencia pueden ser distinguidos con la utilización de marcadores adicionales. Así, las cepas o aislamientos dentro de cada una de las UDTs pueden ser consideradas como familias de clones estrechamente relacionadas, y no como un solo clon (Zingales y col., 2012) y por lo tanto pueden presentar alta variabilidad, como ha sido encontrado en el presente trabajo.

Ha sido ampliamente demostrada la diferente susceptibilidad/resistencia de las distintas cepas o aislamientos de *T. cruzi* a los tratamientos habituales (Filardi y Brener, 1987; Toledo y col., 2003; Martins y col., 2007; Caldas y col., 2008), problemática que se acentuaría aún más si estas diferencias están presentes en un mismo individuo infectado, o incluso dentro de un tejido particular del mismo huésped, como se ha encontrado en el presente estudio. Las infecciones mixtas son comunes en área endémica (Solari y col., 2001; Mantilla y col., 2010) donde cada uno de los individuos infectados está expuesto a múltiples contactos con los insectos vectores y por tanto, a varios tipos de parásitos. El uso de aislamientos naturales en modelos de infección experimental como el presente, permite una mejor representación de lo que realmente ocurre en estos pacientes provenientes de áreas endémicas para *T. cruzi*, en los que la coinfección con diferentes linajes es muy común. El conocimiento sobre la complejidad de las cepas y aislamientos de *T. cruzi* es esencial para determinar los aspectos que intervienen en el tropismo tisular diferencial del parásito, las manifestaciones clínicas de la enfermedad y la resistencia a las drogas (Silva y col., 2012).

Los presentes resultados contribuyen al conocimiento de las complejas interacciones entre *T. cruzi* y su hospedador y serán útiles para determinar el pronóstico de infecciones mixtas, características de las zonas endémicas, y estimular la búsqueda de nuevas estrategias de tratamiento, teniendo en cuenta la alta variabilidad del parásito en un mismo huésped.

CONCLUSIONES

En base a los resultados obtenidos, podemos concluir:

- ✓ Todas las muestras analizadas fueron positivas para la presencia del parásito en la etapa aguda de la infección, demostrando una distribución tisular del parásito aún desde etapas tempranas.
- ✓ La presencia de parásitos en corazón confirma el cardiotropismo de *T. cruzi* y nos permite postular que algunos aislamientos del parásito pueden evadir las defensas del tejido cardíaco, propuestas por algunos autores como protectoras de este órgano.
- ✓ La presencia de parásitos en los cortes de músculo esquelético por otro lado, confirma la importancia de este órgano como reservorio de parásitos.
- ✓ Cada aislamiento estaría conformado por diferentes linajes de *T. cruzi*, que pueden mostrar tropismo diferencial por los tejidos del huésped, lo que resalta la importancia de los presentes resultados para aquellos pacientes de área endémica con alta probabilidad de tener infecciones mixtas.
- ✓ El tropismo de las subpoblaciones de parásitos estaría influenciado por la presencia de una mayor cantidad de subpoblaciones o por interacciones entre parásitos de diferentes linajes. La presencia de un linaje determinado dependerá del “repertorio” de parásitos infectantes en cada caso.
- ✓ Estos resultados pretenden contribuir al entendimiento de las variabilidades clínicas y facilitar el establecimiento de un pronóstico y posterior elección del tratamiento de la enfermedad.

BIBLIOGRAFÍA

- ❖ Abkallo H.M., Tangena J.A., Tang J., Kobayashi N., Inoue M., Zoungrana A., Culleton R. Within-host competition does not select for virulence in malaria parasites. Studies with *Plasmodium yoelii*. PLoS Pathogens, 11(2), e1004628. 2015.
- ❖ Alarcon de Noya B., Diaz-Bello Z., Colmenares C., Ruiz-Guevara R., Mauriello L., Zavala-Jaspe R., Suarez J.A., Abate T., Naranjo L., Paiva M., Rivas L., Castro J., Marques J., Mendoza I., Acquatella H., Torres J., Noya O. Large urban outbreak of orally acquired acute Chagas disease at a school in Caracas, Venezuela. J Infect Dis. 201:1308-1315. 2010.
- ❖ Andrade L.O., Galvão L.M.C., Meirelles M.N.S.L., Chiari E., Pena S.D.J., Macedo A.M. Differential tissue tropism of *Trypanosoma cruzi* strains: an in vitro study. Mem Inst Oswaldo Cruz. 105: 834-837. 2010.
- ❖ Andrade S.G., Magalhaes J.B., Pontes A.L. Evaluation of chemotherapy with benznidazole and nifurtimox in mice infected with *Trypanosoma cruzi* strains of different types. Bull World Health Organ. 63: 721–726. 1985.
- ❖ Andrade S.G., Magalhães J.B. Biodemes and zymodemes of *Trypanosoma cruzi* strains: correlations with clinical data and experimental pathology. Rev Soc Bras Med Trop. 30: 27-35. 1997.
- ❖ Aquilino C., Gonzalez Rubio M.L., Seco E.M., Escudero L., Corvo L., Soto M., Fresno M., Malpartida F., Bonay P. Differential Trypanocidal Activity of Novel Macrolide Antibiotics; Correlation to Genetic Lineage. PLoS ONE. 7: e40901. 2012.
- ❖ Arias L. Situación Epidemiológica de la enfermedad de Chagas congénito en un hospital del conurbano bonaerense, período 2010-2013. Jornada de Zoonosis. 2013.
- ❖ Arguello R.J. Mecanismos de regulación negativa de la respuesta inmune en pacientes con enfermedad de Chagas. Tesis. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2012.
- ❖ Atias A. Enfermedad de Chagas digestiva: Prevalencias y diferencias regionales en america Latina. Revista Médica. 7: 21-24. 1995.
- ❖ Avila H.A., Sigman D.S., Cohen L.M., Millikan R.C., Simpson L. Polymerase chain reaction amplification of *Trypanosoma cruzi* kinetoplast minicircle DNA isolated from whole blood lysates: diagnosis of chronic Chagas' disease. Mol Biochem Parasitol. 48: 211–222. 1991.

Bibliografía

- ❖ Bakos E. Epidemiología de la enfermedad de Chagas y su prevalencia en el norte Argentino. *Ann Academia Nac Arg Agronomía y Veterinaria*. 42: 9-15. 1988.
- ❖ Barcan L., Luna C., Clara L., Sinagra A., Valledor A., De Rissio A.M., Gadano A., García M.M., de Santibanes E., Riarte A. Transmission of *T. cruzi* infection via liver transplantation to a nonreactive recipient for Chagas' disease. *Liver Transpl*. 11: 1112-1116. 2005.
- ❖ Bellera C. Búsqueda racional de nuevos fármacos antichagásicos inhibidores de la cruzipaina. Tesis. Universidad Nacional de La Plata. Facultad de Ciencias Exactas. 2014
- ❖ Beltrán M., Duque S., Guhl F., Herrera C.P., López M.C., Moreno A.L., Nicholls S., Santacruz M.M. Manual de procedimientos para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas. Quebecor Impreandes. 2001.
- ❖ Benchimol Barbosa P.R. The oral transmission of Chagas' disease: an acute form of infection responsible for regional outbreaks. *Int J Cardiol*. 112: 132-133. 2006.
- ❖ Bogliolo A.R., Lauria-Pires L., Gibson W.C. Polymorphisms in *Trypanosoma cruzi*: evidence of genetic recombination. *Acta Trop*. 61: 31-40. 1996
- ❖ Bosseno M.F., Yacksic N., Vargas F., Breniere S.F. Selection of *Trypanosoma cruzi* Clonal Genotypes (Clonet 20 and 39) Isolated from Bolivian Triatomines Following Subculture in Liquid Medium. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 95: 601-607. 2000.
- ❖ Brener Z. En: Wendel S, Brener Z, Camargo ME, Rassi A (eds). Chagas disease (American trypanosomiasis): its impact on transfusion and clinical medicine. São Paulo. *Soc Bras Hematol e Hemoter*. 92: 13-29. 1992.
- ❖ Brener Z., Andrade Z.A., Barral-Neto M. O parasito e sua interaÇao com os hospedeiros in *Trypanosoma cruzi* e Doença de Chagas. Guanabara Koogan S.A. Brasil. Segunda edición. 2000.
- ❖ Breniere S.F., Bosseno M.F., Telleria J., Carrasco R., Vargas F., Yaksic N., Noireau F. Field application of polymerase chain reaction diagnosis and strain typing of *Trypanosoma cruzi* in Bolivian triatomines. *Am J Trop Med Hyg* .53: 179-184. 1995.
- ❖ Briones M.R., Souto R.P., Stolf B.S., Zingales B. The evolution of two *Trypanosoma cruzi* subgroups inferred from rRNA genes can be correlated with the interchange of American mammalian faunas in the Cenozoic and has implications to pathogenicity and host specificity. *Mol Biochem Parasitol*. 104: 219-232. 1999.

Bibliografía

- ❖ Brisse S., Barnabe C., Tibayrenc M. Identification of six *Trypanosoma cruzi* phylogenetic lineages by random amplified polymorphic DNA and multilocus enzyme electrophoresis. *Int J Parasitol.* 30: 35-44. 2000.
- ❖ Brisse S, Verhoef J, Tibayrenc M. Characterisation of large and small subunit rRNA and mini-exón genes further supports the distinction of six *Trypanosoma cruzi* lineages. *Int J Parasitol.* 31: 1218-1226. 2001.
- ❖ Brisse S, Henriksson J, Barnabé C, Douzery EJ, Berkvens D, Serrano M, De Carvalho MR, Buck GA, Dujardin JC, Tibayrenc M. Evidence for genetic exchange and hybridization in *Trypanosoma cruzi* based on nucleotide sequences and molecular karyotype. *Infect Genet Evol.* 2: 173-183. 2003.
- ❖ Buckner F.S., Navabi N. Advances in Chagas disease drug development: 2009- 2010. *Curr Opin Infect Dis.* 23: 609-616. 2010.
- ❖ Burgos J.M., Altcheh J., Bisio M., Duffy T., Valadares H.M., Seidenstein M.E., Piccinali R., Freitas J.M., Levin M.J., Macchi L., Macedo A.M., Freilij H., Schijman A.G. Direct molecular profiling of minicircle signatures and lineages of *Trypanosoma cruzi* bloodstream populations causing congenital Chagas disease. *Int J Parasitol.* 37: 1319-1327. 2007.
- ❖ Burleigh B.A., Andrews N.W. The mechanisms of *Trypanosoma cruzi* invasion of mammalian cells. *Annu. Rev. Microbiol.* 49: 175-200. 1995.
- ❖ Bustamante J.M., Rivarola H.W., Fernandez A.R., Enders J., Fretes R., De Luca D'Oro G., Palma J.A., Paglini-Oliva P. *Trypanosoma cruzi* reinfections provoke synergistic effect and cardiac β -adrenergic receptors' dysfunction in the acute phase of experimental Chagas' disease. *Exp Parasitol* 103: 136-142. 2003.
- ❖ Caldas I.S., Talvani A., Caldas S., Carneiro C.M., de Lana M., da Matta Guedes P.M., Bahia M.T. Benznidazole therapy during acute phase of Chagas disease reduces parasite load but does not prevent chronic cardiac lesions. *Parasitol Res.* 103:413- 421. 2008.
- ❖ Câmara A.C.J., Varela-Freire A.A., Valadares H.M.S., Macedo A.M., D'Avila D.A., Machado C.R., Lages-Silva E., Chiari E., Galvão L. Genetic analyses of *Trypanosoma cruzi* isolates from naturally infected triatomines and humans in northeastern Brazil. *Acta Trop.* 115: 205–211. 2010.
- ❖ Cardinal M.V., Lauricella M.A., Ceballos L.A., Lanati, L., Marcet, P.L., Levin, M.J., Kitron, U., Gurtler, R.E., Schijman, A.G. Molecular epidemiology of domestic and sylvatic *Trypanosoma cruzi* infection in rural northwestern Argentina. *Int J Parasitol.* 38: 1533-1543. 2008.

Bibliografía

- ❖ Carrasco H.J., Frame I.A., Valente S.A., Miles M.A. Genetic exchange as a possible source of genomic diversity in sylvatic populations of *Trypanosoma cruzi*. *Am J Trop Med Hyg* .54: 418-424. 1996.
- ❖ Castanera M.B., Lauricella M.A., Chuit R., Gurtler R.E. Evaluation of dogs as sentinels of the transmission of *Trypanosoma cruzi* in a rural area of north-western Argentina. *Ann Trop Med Parasitol*. 92: 671-683. 1998.
- ❖ Carvalho M.F., de Franco M., Soares V.A. Amastigotes forms of *Trypanosoma cruzi* detected in a renal allograft. *Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo*. 39: 223-226. 1997
- ❖ Center for disease control [Url: <http://www.cdc.gov/parasites/Chagas/biology.html>.] 2005.
- ❖ Clark C.G., Pung O.J. Host specificity of ribosomal DNA variation in sylvatic *Trypanosoma cruzi* from North America. *Mol Biochem Parasitol*. 66: 175-179. 1994.
- ❖ Cohen V., Ceballos V., Rodriguez N., Gonzales Z., Marciano B., Dackiewicz N., Berberian G. Enfermedad de Chagas como causa de masa cerebral ocupante en paciente con leucemia linfoblástica en remisión. *Arch Argent Pediatr*. 108: 134-137. 2010.
- ❖ Corrales R.M., Mora M.C., Negrette O.S., Diosque P., Lacunza D., Virreira M., Breniere S.F., Basombrio M.A. Congenital Chagas disease involves *Trypanosoma cruzi* sub-lineage IId in the northwestern province of Salta, Argentina. *Infect Genet Evol*. 9: 278-282. 2009.
- ❖ Cosentino R.O., Agüero F. A Simple Strain Typing Assay for *Trypanosoma cruzi*: Discrimination of Major Evolutionary Lineages from a Single Amplification Product. *PLoS Negl Trop Dis*. 6: e1777. 2012.
- ❖ Coura J.R., Junqueira A.C., Fernandes O., Valente S.A., Miles M.A. Emerging Chagas disease in Amazonian Brazil. *Trends Parasitol*. 18: 171-176. 2002.
- ❖ Coura J.R. Tripanossomose, doença de Chagas. *Ciênc Cult (São Paulo)*. 55: 30-33. 2003.
- ❖ Cura C., Lucero R.H., Bisio M., Oshiro E., Formichelli L.B., Burgos J.M., Lejona S., Brusés B.L., Hernández D.O., Severini G.V., Velazquez E., Duffy T., Anchart E., Lattes R., Altcheh J., Freilij H., Diez M., Nagel C., Vigliano C., Favaloro L., Favaloro R.R., Merino D.E., Sosa-Estani S., Schijman A.G. *Trypanosoma cruzi* discrete typing units in Chagas disease patients from endemic and non-endemic regions of Argentina. *Parasitology*. 139: 516-21. 2012.
- ❖ Cura C, Schijman A. Relación entre los genotipos de *T. cruzi* y la presentación clínica de la enfermedad de *Chagas*. *Rev Esp Salud Pública* 86: 9-16. 2013.

Bibliografía

- ❖ De Freitas J.M., Augusto-Pinto L., Pimenta J.R., Bastos-Rodrigues L., Goncalves V.F., Teixeira S.M., Chiari E., Junqueira A.C., Fernandes O., Maced A.M., Machado C.R., Pena S.D. Ancestral genomes, sex, and the population structure of *Trypanosoma cruzi*. PLoS Pathog. 2: 226-235. 2006.
- ❖ De Haro Arteaga Irene. Algunos hechos históricos relacionados con la enfermedad de Chagas. *Rev Mex Patol Clin* (México: mediagraphic). 50: 109-112. 2003.
- ❖ Del Puerto R., Nishizawa J.E., Kikuchi M., Iihoshi N., Roca Y., Avilas C., Gianella A., Lora J., Velarde F.U., Renjel L.A., Miura S., Higo H., Komiya N., Maemura K., Hirayama K. Lineage analysis of circulating *Trypanosoma cruzi* parasites and their association with clinical forms of Chagas disease in Bolivia. PLoS Negl Trop Dis. 4: e687. 2010.
- ❖ Del Valle D., Trombetta L.A., Moreno D., Galache V., Semorile K., Bava A.J. Miocarditis aguda y meningoencefalitis por *Trypanosoma cruzi* en un paciente seropositivo al VIH. *Rev Cubana Medicina Tropical*. 66: 458-464. 2014.
- ❖ Dias J.C., Silveira A.C., Schofield C.J. The impact of Chagas disease control in Latin America: a review. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 97: 603-612. 2002.
- ❖ Dias P. Tendencias sociales de la enfermedad de Chagas para las próximas décadas. *Salud Colectiva*, Buenos Aires. 8: 39-48. 2012.
- ❖ Diez M., Favalaro L., Bertolotti A., Burgos J.M., Vigliano C., Lastra M.P., Levin M.J., Arnedo A., Nagel C., Schijman A.G., Favalaro R.R. Usefulness of PCR strategies for early diagnosis of Chagas' disease reactivation and treatment follow-up in heart transplantation. *Am J Transplant*. 7: 1633-1640. 2007.
- ❖ Diez C., Lorenz V., Ortiz S., Gonzalez V., Racca A., Bontempi I., Manattini S., Solari A., Marcipar I. Genotyping of *Trypanosoma cruzi* sublineage in human samples from a North-East Argentina area by hybridization with DNA probes and specific polymerase chain reaction (PCR) *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 82:67-73. 2010
- ❖ Diosque P., Barnabe C., Padilla A.M., Marco J.D., Cardozo R.M., Cimino R.O., Nasser J.R., Tibayrenc M., Basombrio M.A. Multilocus enzyme electrophoresis analysis of *Trypanosoma cruzi* isolates from a geographically restricted endemic area for Chagas' disease in Argentina. *Int J Parasitol*. 33: 997-1003. 2003.
- ❖ Diotaiuti L., Pereira A.S., Loiola C.F., Fernandes A.J., Schofield J.C., Dujardin J.P., Dias J.C., Chiari E. Inter-relation of sylvatic and domestic transmission of *Trypanosoma cruzi* in areas with and without domestic vectorial transmission in Minas Gerais, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 90: 443-448. 1995.

Bibliografía

- ❖ Duffy T., Bisio M., Altech J., Burgos J.M., Diez M., Levin M.J., Favaloro R.R., Freilij H., Schijman A.G. Accurate real-Time PCR strategy for monitoring bloodstream parasitic loads in Chagas disease patients. *PLoS Neglect Trop Dis.* 3: e419. 2009.
- ❖ Duffy T. Desarrollo y aplicación de estrategias de PCR para la genotipificación y cuantificación de *Trypanosoma cruzi*. Tesis. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales Universidad de Buenos Aires. 2010.
- ❖ Dvorak J.A. New in vitro approach to the quantitation of *Trypanosoma cruzi*-vertebrate cell interaction. En: *New approaches in American trypanosomiasis research*, págs.1089-120. PAHO/WHO Scientific. 318. 1975.
- ❖ Falla A., Herrera C., Fajardo A., Montilla M., Vallejo G.A., Guhl F. Haplotype identification within *Trypanosoma cruzi* I in Colombian isolates from several reservoirs, vectors and humans. *Acta Trop.* 110: 15-21. 2009.
- ❖ Fraidenraich D., Peña C., Isola E.L., Lammel E.M., Coso O., Añel A.D., Baralle F., Torres H.N., Flawia M.M. An alpha D-globin fragment from *Triatoma infestans* hindgut stimulates *Trypanosoma cruzi* adenylyl cyclase and promotes metacyclogenesis. *Biol. Res.* 26: 279-283. 1993.
- ❖ Fernandes O., Souto R.P., Castro J.A., Pereira J.B., Fernandes N.C., Junqueira A.C., Naiff R.D., Barrett T.V., Degraive W., Zingales B., Campbell D.A., Coura J.R. Brazilian isolates of *Trypanosoma cruzi* from humans and triatomines classified into two lineages using mini-exón and ribosomal RNA sequences. *Am J Trop Med Hyg.* 5: 807-811. 1998.
- ❖ Ferreira Bellini M., Silistino-Souza R., Varella-Garcia M., Tercília Vilela de Azeredo-Oliveira M., Silva A.E. Biologic and genetics aspects of Chagas disease at endemic areas. *J Trop Med.* 11. 2012.
- ❖ Fife EH J.r. *Trypanosoma* (Schizotrypanum) *cruzi*. En: *Parasitic protozoa. Vol. I. Taxonomy, kinetoplastids, and flagellates of fish.* 135-173. 1977.
- ❖ Filardi L.S., Brener Z. Susceptibility and natural resistance of *Trypanosoma cruzi* strains to drugs used clinically in Chagas disease. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 81: 755-759. 1987.
- ❖ Gaunt M.W., Yeo M., Frame I.A., Stothard J.R., Carrasco H.J., Taylor M.C., Mena S.S., Veazey P., Miles G.A., Acosta N., De Arias A.R., Miles M.A. Mechanism of genetic exchange in American trypanosomes. *Nature.* 421: 936-939. 2003.
- ❖ Gallego Berenguer J. Manual de Parasitología: morfología y biología de los parásitos de interés sanitario. *Studi General (Universitat de Barcelona).* Barcelona. España. 2007.

Bibliografía

- ❖ Gomes ML, Macedo AM, Pena SDJ, Chiari E. Genetic relationships between *Trypanosoma cruzi* strains isolated from chronic Chagasic patients in Southern Brazil as revealed by RAPD and SSR-PCR analysis. *Acta Trop.* 69: 99-109. 1998.
- ❖ Guhl F, Jaramillo C, Carranza JC, Vallejo GA. Molecular characterization and diagnosis of *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli*. *Arch Med Res.* 33: 362-370. 2002.
- ❖ Guhl, F. Enfermedad de Chagas: Realidad y perspectivas. *Rev Biomed.* 20:228-234. 2009.
- ❖ Gutierrez F.R., Guedes P.M., Gazzinelli R.T., Silva J.S. The role of parasite persistence in pathogenesis of Chagas heart disease. *Parasite Immunol.* 31: 673-685. 2009.
- ❖ Gurtler R.E., Segura E.L., Cohen J.E. Congenital transmission of *Trypanosoma cruzi* infection in Argentina. *Emerg Infect Dis.* 9: 29-32. 2003.
- ❖ Higuchi M.L., Benvenuti L.A., Reis M.M., Metzger M. Pathophysiology of the heart in Chagas' disease: current status and new developments. *Cardiovasc Res* 60: 96-107. 2003. *Cardiovasc Res.* 60: 96-107. 2003.
- ❖ Isola E.L., Lammel E.M., González Cappa S.M. *Trypanosoma cruzi*: differentiation after interaction of epimastigotes and *Triatoma infestans* intestinal homogenate. *Exp Parasitol.* 62: 329-335. 1986.
- ❖ Joiner K., Hieny S., Kirchhoff L.V., Sher A. gp72, the 72 kilodalton glycoprotein, is the membrane acceptor site for C3 on *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. *J Exp Med.* 161: 1196-1212. 1985
- ❖ Katzin V.J., Añasco N., De Isola E.L., González Cappa S.M. Characterization of *Trypanosoma cruzi* metacyclic forms differentiated from epimastigotes. A comparative study between both stages. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 25: 55-61. 1983.
- ❖ Kierszerbaum F. Where do we stand on the autoimmunity hypothesis of Chagas disease? *TRENDS in Parasitol.* 21: 513-516. 2005.
- ❖ Lachaud L, Chabbert E, Dubessay P, Reynes J, Lamothe J, Bastien P. Comparison of various sample preparation methods for PCR diagnosis of visceral leishmaniasis using peripheral blood. *J Clin Microb.* 39: 613-617. 2001.
- ❖ Lages-Silva E., Ramirez L.E., Pedrosa A.L., Crema E., Da Cunha Galvao L.M., Junho Pena S.D., Macedo A.M., Chiari E. Variability of kinetoplast DNA gene signatures of *Trypanosoma cruzi* II strains from patients with different clinical forms of Chagas' disease in Brazil. *J Clin Microbiol.* 44: 2167-2171. 2006.

Bibliografía

- ❖ Lauricella M.A., Stariolo R.L., Riarte A.R., Segura E.L., Gurtler R.E. Distribution and pathogenicity of *Trypanosoma cruzi* isolated from peridomestic populations of *Triatoma infestans* and *Triatoma guasayana* from rural Western Argentina. Mem Inst Oswaldo Cruz. 100: 123-129. 2005.
- ❖ Liarte D.B., Murta S.M., Steindel M., Romanha A.J. *Trypanosoma cruzi*: multiplex PCR to detect and classify strains according to groups I and II. Exp Parasitol. 123: 283-291. 2009.
- ❖ Llewellyn M.S., Miles M.A., Carrasco H.J., Lewis M.D., Yeo M., Vargas J., Torrico F., Diosque P., Valente V., Valente S.A., Gaunt M.W. Genome-scale multilocus microsatellite typing of *Trypanosoma cruzi* discrete typing unit I reveals phylogeographic structure and specific genotypes linked to human infection. PLoS Pathog. 5: e1000410. 2009
- ❖ Lo Presti M.S., Bustamante J.M., Rivarola H.W., Fernández A.R., Enders J., Fretes R., Levin G., Paglini-Oliva P. Changes in the cardiac β adrenergic system provoked by different *T. cruzi* strains. Int J Cardiol. 111: 104-112. 2006.
- ❖ Lo Presti M.S., Esteves B.H., Moya D., Bazán P.C., Strauss M., Báez A.L., Pizzi R., Quispe Ricalde M.A., Valladares B., Rivarola H.W., Paglini-Oliva P.A. Circulating *Trypanosoma cruzi* populations differ from those found in the tissues of the same host during acute experimental infection. Acta Trop. 133: 98-109. 2014.
- ❖ Lorca M., Veloso C., Munoz P., Bahamonde M.I., Garcia A. Diagnostic value of detecting specific IgA and IgM with recombinant *Trypanosoma cruzi* antigens in congenital Chagas' disease. Am J Trop Med Hyg. 52: 512-515. 1995.
- ❖ Macedo A.M., Pena S.D. Genetic Variability of *Trypanosoma cruzi*: Implications for the Pathogenesis of Chagas Disease. Parasitol Today. 14: 119-24. 1998.
- ❖ Macedo A.M., Machado C.R., Oliveira R.P., Pena S.D.J. *Trypanosoma cruzi*: genetic structure of populations and relevance of genetic variability to the pathogenesis of Chagas disease. Mem Inst Oswaldo Cruz. 99: 1-12. 2004.
- ❖ Machado C.A., Ayala F.J. Nucleotide sequences provide evidence of genetic Exchange among distantly related lineages of *Trypanosoma cruzi*. Proc Natl Acad Sci U S A. 98: 7396-7401. 2001.
- ❖ Manoel-Caetano F. da S., Silva A.E. Implications of genetic variability of *Trypanosoma cruzi* for the pathogenesis of Chagas disease. Cad Saude Publica 23: 2263-74. 2007.

Bibliografía

- ❖ Manque P.A., Probst C., Pereira M.C.S., Rampazzo R.C., Ozaki L.S., Pavoni D.P., Silva Neto D.T., Carvalho M.R., Xu P., Serrano M.G., Alves J.M., Meirelles M.N., Goldenberg S., Krieger M.A., Buck G.A. *Infect Immun.* 79: 1855–1862. 2011.
- ❖ Mantilla J.C., Zafra G., Macedo A.M., Gonzáles C.I. Mixed infection of *Trypanosoma cruzi* I and II in a Colombian cardiomyopathic patient. *Human Pathol.* 41: 610-613. 2010.
- ❖ Marcet P.L., Duffy T., Cardinal M.V., Burgos J.M., Lauricella M.A., Levin M.J., Kitron U., Gurtler R.E., Schijman A.G. PCR-based screening and lineage identification of *Trypanosoma cruzi* directly from faecal samples of triatomine bugs from northwestern Argentina. *Parasitology.* 132: 57-65. 2006.
- ❖ Marin-Neto J.A., Rassi A., Morillo C.A. Rationale and design of a randomized placebo-controlled trial assessing the effects of etiologic treatment in Chagas' cardiomyopathy: the BENznidazole Evaluation For Interrupting Trypanosomiasis. *Am Heart J.* 156: 37 – 43. 2008.
- ❖ Martínez I., Espinoza B. *Trypanosoma cruzi*: de la prehistoria americana a Europa del siglo XXI. *Gaceta Biomédicas* (Ciudad Universitaria: Universidad Nacional Autónoma de México). 17: 10-12.. 2012.
- ❖ Martins H.R., Silva R.M., Valadares H.M., Toledo M.J., Veloso V.M., Vitelli-Avelar D.M., Carneiro C.M., Machado-Coelho G.L., Bahia M.T., Martins-Filho O.A., Macedo A.M., Lana M. Impact of dual infections on chemotherapeutic efficacy in BALB/c mice infected with major genotypes of *Trypanosoma cruzi*. *Antimicrob Agents Chemother.* 51: 3282-3289. 2007.
- ❖ Martins L.P., Castanho R.E., Nogueira A.B., Silva O.T., Gusmão A.S. Incidence of *Trypanosoma cruzi* transmission through breastfeeding during acute experimental Chagas disease. *Braz J Infect Dis.* 15: 116-118. 2011.
- ❖ Mejía A., Triana O. Análisis por LSSP- PCR de la variabilidad genética de *Trypanosoma cruzi* en sangre y órganos de ratones. *Biomédica.* 25: 76-86. 2005.
- ❖ Mendonça M.B., Nehme N.S., Santos S.S., Cupolillo E., Vargas N., Junqueira A., Naiff R.D., Barrett T.V., Coura J.R., Zingales B., Fernandes O. Two main clusters within *Trypanosoma cruzi* zymodeme 3 are defined by distinct regions of the ribosomal RNA cistron. *Parasitology.* 124: 177-184. 2002.
- ❖ Menghi C., Gatta C., Angeleri A., Rocher A., Palaoro L. *Trypanosoma cruzi*: tripomastigotes en líquido pleural de un paciente con SIDA. *Rev Chil Infect.* 28: 597-598. 2011.

Bibliografía

- ❖ Ministerio de Salud. Programa Nacional de Chagas. 2012.
- ❖ Molyneux D.H., Mitre E., Bockarie M.J., Kelly-Hope L.A. Filaria zoogeography in Africa: ecology, competitive exclusion, and public health relevance. *Trends in Parasitology*. 30: 163-169. 2014.
- ❖ Moncayo A. Chagas disease: current epidemiological trends after the interruption of vectorial and transfusional transmission in the Southern Cone countries. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 98: 577-591. 2003.
- ❖ Moncayo A., Ortiz Yanine M.I. An update on Chagas disease (human American trypanosomiasis). *Ann Trop Med Parasitol*. 100: 663-677. 2006.
- ❖ Montamat E.E., De Luca D'Oro G.M., Galerano R.H., Sosa R., Blanco A. Characterization of *Trypanosoma cruzi* populations by zymodemes: correlation with clinical picture. *Am J Trop Med Hyg*. 55: 625-628. 1996.
- ❖ Moser D.R., Kirchhoff L.V., Donelson J.E. Detection of *Trypanosoma cruzi* by DNA amplification using the polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol*. 27: 1477-1482. 1989.
- ❖ Mordini O. D., Bavio E., Beloscar J., Tognoni G., Sosa F. J. Reyes O., Pairone E., Lacuza D., Manzur R., Redondo M., Hernandez D., Mujica H. Enfermedad de Chagas en Argentina. "Registro Nacional de enfermedad de Chagas de la Federación Argentina de Cardiología". *Rev Fed Arg Cardiol*. 45: 84-92. 2016.
- ❖ Morillo C.A., Marin-Neto J.A., Avezum A., Sosa-Estani S., Rassi A.Jr., Rosas F., Villena E., Quiroz R., Bonilla R., Britto C., Guhl F., Velazquez E., Bonilla L., Meeks B., Rao-Melacini P., Pogue J., Mattos A., Lazdins J., Rassi A., Connolly S.J., Yusuf S., BENEFIT Investigators. Randomized Trial of Benznidazole for Chronic Chagas' Cardiomyopathy. *New England J Med*. 373: 1295-1306. 2015.
- ❖ Nogueira N., Bianco C., Cohn Z. Studies on the selective lysis and purification of *Trypanosoma cruzi*. *J Exp Med*. 142: 224-229. 1975.
- ❖ Noireau F., Bosseno M.F., Carrasco R., Telleria J., Vargas F., Camacho C., Yaksic N., Breniere S.F. Sylvatic triatomines (Hemiptera: Reduviidae) in Bolivia: trends toward domesticity and possible infection with *Trypanosoma cruzi* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae). *J Med Entomol* 32: 594-598. 1995.
- ❖ Noireau F., Gutierrez T., Flores R., Breniere F., Bosseno M.F., Wisnivesky-Colli C. Ecogenetics of *Triatoma sordida* and *Triatoma guasayana* (Hemiptera: reduviidae) in the Bolivian chaco. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 94: 451-457. 1999.

Bibliografía

- ❖ Oliveira R.P., Macedo A.M., Chiari E., Pena S.D.J. An alternative approach to evaluating the intraspecific genetic variability of parasites. *Parasitol Today*. 13: 196-200. 1997.
- ❖ Oliveira R.P., Broude N.E., Macedo A.M., Cantor C.R., Smith C.L., Pena S.D. Probing the genetic population structure of *Trypanosoma cruzi* with polymorphic microsatellites. *Proc Natl Acad Sci U S A* .95: 3776-3780. 1998.
- ❖ OMS. Estimación cuantitativa de la enfermedad de Chagas en las Américas. Organización Mundial de la Salud. 2006.
- ❖ OMS. Reporte del grupo de trabajo científico sobre la enfermedad de Chagas. Organización Mundial de la Salud. 2002.
- ❖ OMS. World Health Organization on behalf of the Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases. Organización Mundial de la Salud. 2007.
- ❖ Pena D.A., Eger I., Nogueira L., Heck N., Menin Á., Báfica A., Steindel M. Selection of TcII *Trypanosoma cruzi* population following macrophage infection. *J Infect Dis*. 204: 478-486. 2011.
- ❖ Pinto A.Y., Valente S.A., Valente Vda C. Emerging acute Chagas disease in Amazonian Brazil: case reports with serious cardiac involvement. *Braz J Infect Dis*. 8: 454-460. 2004.
- ❖ Pinto Dias, J.C. (2000). Epidemiología. En: *Trypanosoma cruzi* e doença de Chagas. Brener, Z., Andrade Z.A., Barranl-Netto M. (Edts.). Rio de Janeiro. pp 48-74.
- ❖ Ragone P.G., Pérez Brandán C., Padilla A.M., Monje Rumi M., Lauthier J.J., Alberti D'Amato A.M., Tomasini N., Cimino R.O., Romero N.M., Portelli M., Nasser J.R., Basombrío M.A., Diosque P. Biological behavior of different *Trypanosoma cruzi* isolates circulating in an endemic area for Chagas disease in the Gran Chaco region of Argentina. *Acta Tropica*. 123: 196-201. 2012.
- ❖ Ragone P. G., Brandán C. P., Monje Rumi M., Tomasini N., Lauthier J. J., Cimino R. O., Uncos A., Ramos F., Anahí M., D'Amato A., Basombrío M. A., Diosque P. Experimental Evidence of Biological Interactions among Different Isolates of *Trypanosoma cruzi* from the Chaco Region. *PLOS One*. 10: e0119866. 2015.
- ❖ Ramirez C.B., Jaramillo A., Becerra A., Mansalve E., Villareal W., Villabona R. Lesión cerebral como presentación de la enfermedad de Chagas. Primer caso reportado en Colombia. *Acta Neurol Colomb*. 23: 15-18. 2007.

Bibliografía

- ❖ Ramírez J.D., Guhl F., Rendón L.M., Rosas F., Marin-Neto J.A., Morillo C.A. Chagas cardiomyopathy manifestations and *Trypanosoma cruzi* genotypes circulating in chronic Chagasic patients. PLoS Neglect Trop. 4: e899. 2010.
- ❖ Riarte A., Luna C., Sabatiello R., Sinagra A., Schiavelli R., De Rissio A., Maiolo E., Garcia M.M., Jacob N., Pattin M., Lauricella M., Segura E.L., Vazquez M. Chagas' disease in patients with kidney transplants: 7 years of experience 1989-1996. Clin Infect Dis. 29: 561-567. 1999.
- ❖ Richie T.L. Interactions between malaria parasites infecting the same vertebrate host. Parasitology. 96: 607-639. 1988.
- ❖ Risso M.G., Sartor P.A., Burgos J.M., Briceño L., Rodríguez E.M., Guhl F., Chavez O.T., Espinoza B., Monteón V.M., Russomando G., Schijman A.G., Bottasso O.A., Leguizamón M.S. Immunological identification of *Trypanosoma cruzi* lineages in human infection along the endemic area. Am J Trop Med Hyg. 84: 78- 84. 2011.
- ❖ Rivarola H.W., Paglini-Oliva P. New insights into pathophysiology and treatment in Chagas-Mazza disease. Rev Fac Cien Med Univ Nac Cordoba. 68: 154-163. 2011.
- ❖ Roellig D.M., Brown E.L., Barnabe C., Tibayrenc M., Steurer F.J., Yabsley M.J. Molecular typing of *Trypanosoma cruzi* isolates, United States. Emerg Infect Dis. 14: 1123-1125. 2008.
- ❖ Roellig D.M., McMillan K., Ellis A.E., Vandeberg J.L., Champagne D.E., Yabsley M.J. Experimental infection of two South American reservoirs with four distinct strains of *Trypanosoma cruzi*. Parasitology. 137: 959-66. 2010.
- ❖ Rodríguez S.P., Sanz M.M., Aponte L.M. Enfermedad de Chagas: Chagoma cerebral con afectación el cuerpo calloso en un paciente con SIDA. Rev Colomb Radiol. 20:2793-2797. 2009.
- ❖ Salvatella R. Aspectos Epidemiológicos de la Enfermedad de Chagas.2009.
- ❖ Salvatella R. Chagas en Uruguay, 1937-2016.Información básica para su prevención, control y atención. Arch Pediatr Urug. 87: 49-52. 2016.
- ❖ Schenone H., Contreras M., Solari A., Garcia A., Rojas A., Lorca M. Nifurtimox treatment of chronic Chagasic infection in children. Rev Med Chil. 131: 1089-1090. 2003.
- ❖ Schmunis G.A., Yadon Z.E. Chagas disease: a Latin American health problem becoming a world health problem. Acta Trop. 115: 14-21. 2010.
- ❖ Schmunis G.A. Risk of Chagas disease through transfusions in the Americans. Medicina (B Aires). 59: 125-134. 1999.

Bibliografía

- ❖ Schofield C.J., Diotaiuti L., Dujardin J.P. The process of domestication in Triatominae. Mem Inst Oswaldo Cruz. 94: 375-378. 1999.
- ❖ Siffo S. Estudio de carga parasitaria y mediadores inflamatorios en tejidos murinos infectados con *Trypanosoma cruzi* tratados con el ligando natural de PPAR γ . Tesis. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales Universidad de Belgrano. 2014.
- ❖ Silva J.J.N., Pavanelli W.R., Gutierrez F.R., Alves Lima F.C., Ferreira da Silva A.B., Santana Silva J., Wagner Franco D. Complexation of the anti-*Trypanosoma cruzi* drug benznidazole improves solubility and efficacy. J Med Chem. 51: 4104-4114. 2008.
- ❖ Silva Valadares H.M., Ramos Pimenta J., Segatto M., Veloso V.M., Gomes M.L., Chiari E., Gollob K.J., Bahia M.T., de Lana M., Franco G.R., Machado C.R., Pena S.D., Macedo A.M. Unequivocal Identification of Subpopulations in Putative Multiclonal *Trypanosoma cruzi* Strains by FACs Single Cell Sorting and Genotyping. PLoS Negl Trop Dis. 7: e1722. 2012.
- ❖ Solari A., Campillay R., Ortiz S., Wallace A. Identification of *Trypanosoma cruzi* genotypes circulating in Chilean Chagasic patients. Exp Parasitol. 97: 226-233. 2001.
- ❖ Souto R.P., Fernandes O., Macedo A.M., Campbell D.A., Zingales B. DNA markers define two major phylogenetic lineages of *Trypanosoma cruzi*. Mol Biochem Parasitol. 83: 141-152. 1996.
- ❖ Souto R.P., Vargas N., Zingales B. *Trypanosoma rangeli*: discrimination from *Trypanosoma cruzi* based on a variable domain from the large subunit ribosomal RNA gene. Exp Parasitol. 91: 306-314. 1999.
- ❖ Steindel M., Kramer Pacheco L., Scholl D., Soares M., Hoehr de Moraes M., Eger I., Kosmann C., Marques Sincero T.C., Hermes Stoco P., Fonseca Murta S.M., Carvalho-Pinto C.J., Grisard E.D. Characterization of *Trypanosoma cruzi* isolated from humans, vectors, and animal reservoirs following an outbreak of acute human Chagas disease in Santa Catarina State, Brazil. Diagnost Microbiol Infect Dis. 60: 25-32. 2008.
- ❖ Sturm N.R., Campbell D.A. Alternative lifestyles: the population structure of *Trypanosoma cruzi*. Acta Trop. 115: 35-43. 2010.
- ❖ Sturm N.R., Vargas N.S., Westenberger S.J., Zingales B., Campbell D.A. Evidence for multiple hybrid groups in *Trypanosoma cruzi*. Int J Parasitol. 33: 269-279. 2003.
- ❖ Storino R., Milei J. Enfermedad de Chagas. Ed. Mosby-Doyma, Buenos Aires. 1994.
- ❖ Strauss M., Lo Presti M.S., Bazán P.C., Báez A., Fauro R., Esteves B., Sánchez Negrete O., Cremonezzi D., Paglini-Oliva P.A., Rivarola H.W. Clomipramine and benznidazole

Bibliografía

- association for the treatment of acute experimental *Trypanosoma cruzi* infection. *Parasitol Int.* 62: 293-299. 2013.
- ❖ Tarragona S., Salomón C., Jiménez-Kairuz A., Lamas M., Orlandi S., Leonardi D., Maggia N., Paredes A., Romañuk C., García M. Diseño y preparación de formas farmacéuticas sólidas de benznidazol para el tratamiento de la enfermedad de Chagas. *Rev Argent Salud Pública.* 4: 6-13. 2013.
 - ❖ Telleria J., Lafay B., Virreira M., Barnabe C., Tibayrenc M., Svoboda M. *Trypanosoma cruzi*: sequence analysis of the variable region of kinetoplast minicircles. *Exp Parasitol.* 114: 279-288. 2006.
 - ❖ Tibayrenc M. Genetic epidemiology of parasitic protozoa and other infectious agents: the need for an integrated approach. *Int J Parasitol.* 28: 85-104. 1998.
 - ❖ Tibayrenc M. Genetic subdivisions within *Trypanosoma cruzi* (Discrete Typing Units) and their relevance for molecular epidemiology and experimental evolution. *Kinetoplastid Biol Dis.* 2: 12. 2003.
 - ❖ Torrico F., Alonso-Vega C., Suarez E., Rodriguez P., Torrico M.C., Dramaix M., Truyens C., Carlier Y. Maternal *Trypanosoma cruzi* infection, pregnancy outcome, morbidity, and mortality of congenitally infected and non-infected newborns in Bolivia. *Am J Trop Med Hyg.* 70: 201-209. 2004.
 - ❖ Toledo M.J., Bahia M.T., Carneiro C.M., Martins-Filho O.A., Tibayrenc M., Barnabé C., Tafuri W.L., De Lana M. Chemotherapy with benznidazole and itraconazole for mice infected with different *Trypanosoma cruzi* clonal genotypes. *Antimicrob Agents Chemother.* 47: 223-230. 2003.
 - ❖ Tolosa de Talamoni N., Moya M., Martini C., Campana V., López C., Ponzio M. Reglamentación para el cuidado y uso de animales de experimentación en dependencia de la Facultad de Ciencias Médicas y Facultad de Odontología. Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio. UNC. 2010.
 - ❖ Urbina J.A. Specific chemotherapy of Chagas disease: relevance, current limitations and new approaches. *Acta Trop.* 115: 55–68. 2010.
 - ❖ Vago A.R., Andrade L.O., Leite A.A., d'Ávila Reis D., Macedo A.M., Adad S.J., Tostes Jr. S., Moreira M.C.V., Filho G.B., Pena S.D.J. Genetic characterization of *Trypanosoma cruzi* directly from tissues of patients with chronic Chagas disease: differential distribution of genetic types into diverse organs. *Am J Pathol.* 156: 1805-1809. 2000.

Bibliografía

- ❖ Vago A.R., Macedo A.M., Oliveira R.P., Andrade L.O., Chiari E., Galvão L.M., Reis D., Pereira M.E., Simpson A.J., Tostes S., Pena S.D. Kinetoplast DNA signatures of *Trypanosoma cruzi* strains obtained directly from infected tissues. *Am J Pathol.* 149: 2153- 2159. 1996.
- ❖ Vallejo G.A. Estudios comparativos entre las secuencias de kDNA de *Trypanosoma cruzi* y *Trypanosoma rangeli* y su aplicación en el diagnóstico molecular de la Tripanosomiasis Americana. *Actual Biol.* 20: 43-56. 1998.
- ❖ Vallejo G., Carranza J., Guhl F. Epidemiología molecular de *Trypanosoma cruzi* y *Trypanosoma rangeli* en Colombia y en América. *Entornos.* 13: 1-8. 2001.
- ❖ Velazquez M., Diez C.N., Mora C., Diosque P., Marcipar I.S. *Trypanosoma cruzi*: an analysis of the minicircle hypervariable regions diversity and its influence on strain typing. *Exp Parasitol.* 120: 235-241. 2008.
- ❖ Velázquez E.B., Rivero R., De Rissio A.M., Malagrino N., Esteva M.I., Riarte A.R., Ruiz A.M. Predictive role of polymerase chain reaction in the early diagnosis of congenital *T. cruzi* infection. *Acta Trop.* 137: 195–200. 2014.
- ❖ Virreira M., Torrico F., Truyens C., Alonso-Vega C., Solano M., Carlier Y., Svoboda M. Comparison of polymerase chain reaction methods for reliable and easy detection of congenital *Trypanosoma cruzi* infection. *Am J Trop Med Hyg.* 68: 574-582. 2003.
- ❖ Wainszelbaum M.J., Belaunzarán M.L., Lammel E.M., Florin-Christensen M., Florin-Christensen J., Isola E.L. Free fatty acids induce cell differentiation to infective forms in *Trypanosoma cruzi*. *Biochem J.* 375: 705-712. 2003.
- ❖ Westenberger S.J., Barnabe C., Campbell D.A., Sturm N.R. Two hybridization events define the population structure of *Trypanosoma cruzi*. *Genetics.* 171: 527-543. 2005.
- ❖ Wincker P., Bosseno M.F., Britto C., Yaksic N., Cardoso M.A., Morel C.M., Brenière S.F. *FEMS Microbiol Lett.* 124: 419-423. 1994.
- ❖ Wisnivesky-Colli C., Gurtler R.E., Solarz N.D., Schweigmann N.J., Pietrokovsky S.M., Alberti A., Flo J. Dispersive flight and house invasion by *Triatoma guasayana* and *Triatoma sordida* in Argentina. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 88: 27-32. 1993.
- ❖ Wisnivesky-Colli C., Vezzani D., Pietrokovsky S.M., Scurti H., Iriarte J. Ecological characteristics of *Triatoma patagonica* at the southern limit of its distribution (Chubut, Argentina). *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 98: 1077-1081. 2003.
- ❖ Yeo M., Acosta N., Llewellyn M., Sanchez H., Adamson S., Miles G.A., Lopez E., Gonzalez N., Patterson J.S., Gaunt M.W., De Arias A.R., Miles M.A. Origins of Chagas

Bibliografía

- disease: Didelphis species are natural hosts of *Trypanosoma cruzi* I and armadillos hosts of *Trypanosoma cruzi* II, including hybrids. *Int J Parasitol.* 35: 225-233. 2005.
- ❖ Zabala J.P. La enfermedad en su laberinto: avances, desafíos y paradojas de cien años del Chagas en Argentina. *Salud Colectiva, Buenos Aires.* 8: 9-21. 2012.
 - ❖ Zaidemberg M., Segovia A. Congenital Chagas disease in the city of Salta, Argentina. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 35: 35-43. 1993.
 - ❖ Zaidemberg M., Spillmann C., Carrizo R. Control de Chagas en la Argentina. Su evolución. *Rev Arg Cardiología.* 72: 375-380. 2004.
 - ❖ Zeledon R. Epidemiology, modes of transmission and reservoir hosts of Chagas' disease. *Ciba Foundation Symposium.* 20: 51-77. 1974.
 - ❖ Zingales B., Andrade S.G., Briones M.R., Campbell D.A., Chiari E., Fernandes O., Guhl F., Lages-Silva E., Macedo A.M., Machado C.R., Miles M.A., Romanha A.J., Sturm N.R., Tibayrenc M., Schijman A.G. A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 104: 1051-1054. 2009.
 - ❖ Zingales B., Miles M.A., Campbell D.A., Tibayrenc M., Macedo A.M., Teixeira M.M., Schijman A.G., Llewellyn M.S., Lages-Silva E., Machado C.R., Andrade S.G., Sturm N.R. The revised *Trypanosoma cruzi* subspecific nomenclature: rationale, epidemiological relevance and research applications. *Infect Genet Evol.* 12: 240-253. 2012.