



ESPE
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE
LA VIDA Y LA AGRICULTURA**

**CARRERA DE INGENIERÍA EN
BIOTECNOLOGÍA**

TRABAJO DE TITULACIÓN

**TEMA: “CARACTERIZACIÓN BIOLÓGICA E
HISTOPATOLÓGICA DE CEPAS DE *Trypanosoma cruzi*
AISLADAS EN EL ECUADOR: IMPLICACIÓN DE LA
DIVERSIDAD GENÉTICA DEL PARÁSITO EN LA VIRULENCIA
Y PATOGENICIDAD EN EL MODELO MURINO”.**

AUTOR: QUIJIA QUEZADA CHRISTIAN RAFAEL

DIRECTORA: TORRES MARBEL, Ph.D

DIRECTOR EXTERNO: GARZÓN EDWIN, Ph.D

SANGOLQUÍ 13 DE ABRIL

2016



**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y LA
AGRICULTURA**

CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

CERTIFICACIÓN

Certifico que el trabajo de titulación, “**CARACTERIZACIÓN BIOLÓGICA E HISTOPATOLÓGICA DE CEPAS DE *Trypanosoma cruzi* AISLADAS EN EL ECUADOR: IMPLICACIÓN DE LA DIVERSIDAD GENÉTICA DEL PARÁSITO EN LA VIRULENCIA Y PATOGENICIDAD EN EL MODELO MURINO**” realizado por **CHRISTIAN RAFAEL QUIJIA QUEZADA**, ha sido revisado en su totalidad y analizado por el software anti-plagio, el mismo cumple con los requisitos teórico, científicos, técnicos, metodológicos y legales establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas-ESPE, por lo tanto me permito acreditarlo y autorizar al señor **CHRISTIAN RAFAEL QUIJIA QUEZADA** para que lo sustente públicamente.

Sangolquí ,18 de Abril 2016

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Marbel Torres Arias', is written over a horizontal dotted line.

MARBEL TORRES ARIAS

DIRECTORA



ESPE
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y LA
AGRICULTURA**

CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

AUTORÍA DE RESPONSABILIDAD

Yo, **CHRISTIAN RAFAEL QUIJIA QUEZADA**, con cedula de identidad N° 172094971-6 declaro que este trabajo de titulación “**CARACTERIZACIÓN BIOLÓGICA E HISTOPATOLÓGICA DE CEPAS DE *Trypanosoma cruzi* AISLADAS EN EL ECUADOR: IMPLICACIÓN DE LA DIVERSIDAD GENÉTICA DEL PARÁSITO EN LA VIRULENCIA Y PATOGENICIDAD EN EL MODELO MURINO**”, ha sido desarrollado considerando los métodos de investigación existente, así como también se ha respetado los derechos intelectuales de terceros considerándose en las citas bibliográfica.

Consecuentemente declaro que este trabajo es de mi autoría en virtud de ello me declaro responsable del contenido, veracidad y alcance de la investigación mencionada.

Sangolquí ,18 de Abril 2016

Una firma manuscrita en tinta azul sobre una línea horizontal.

CHRISTIAN RAFAEL QUIJIA QUEZADA

C.C 172094971-6



**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y LA
AGRICULTURA**

CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

AUTORIZACIÓN

Yo, **CHRISTIAN RAFAEL QUIJIA QUEZADA**, autorizo a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE publicar en la biblioteca Virtual de la institución el presente trabajo de titulación, **“CARACTERIZACIÓN BIOLÓGICA E HISTOPATOLÓGICA DE CEPAS DE *Trypanosoma cruzi* AISLADAS EN EL ECUADOR: IMPLICACIÓN DE LA DIVERSIDAD GENÉTICA DEL PARÁSITO EN LA VIRULENCIA Y PATOGENICIDAD EN EL MODELO MURINO”** cuyo contenido, ideas y criterios son de mi autoría y responsabilidad. .

Sangolquí ,18 de Abril 2016

CHRISTIAN RAFAEL QUIJIA QUEZADA

C.C 172094971-6

DEDICATORIA

La presente tesis se la dedico a mi familia, que gracias a su apoyo incondicional pude concluir mi carrera universitaria.

A mis padres y hermanos por su apoyo y confianza en todo lo necesario para cumplir mis objetivos como persona y estudiante.

A mi padre Miguel y a mi madre Delfida, por brindarme los recursos necesarios, por hacer de mí mejor persona a través de sus consejos, enseñanzas y amor.

A mis hermanos Miguel y Delfida, en especial a mi hermana Angela por apoyarme y enseñarme a que todas las metas que uno se plantean, se puede lograr con perseverancia y esfuerzo.

Christian Rafael Quijia Quezada

AGRADECIMIENTO

Agradezco a mis padres por esforzarse y dar todo el apoyo incondicional. A impulsarme a ser una gran persona cada día, como la humildad. Así logrando a alcanzar grandes metas en mi vida.

A mis hermanos en especial Angela por darme el apoyo moral y espiritual, que gracias a ella escogí una gran carrera universitaria.

A mi tutor, Dr. Edwin Garzón, por su esfuerzo y dedicación, además de sus conocimientos, orientación, su persistencia que ha sido motivación fundamental para mi formación.

A mi tutora Dra. Marbel Torres, por su orientación, seguimiento y supervisión, que ha sido fundamental para la conclusión de este proyecto.

A Lorena y Soledad que apoyaron en todo el proceso del proyecto, ayudándome a concluir el proyecto.

A Lic. Anaid por enseñarme y dedicar tiempo en sus conocimientos y seriedad que fue fundamental para el inicio del proyecto.

A todos los integrantes del Centro de Enfermedades Infecciosas y Crónicas, que dieron su apoyo en sus conocimientos y en diferentes formas. En especial Dr. Jaime Costales, Dra. Anita Villacis, y a los demás personas que pertenecen a este gran grupo de trabajo.

A la universidad por darme todo el conocimiento y en especial por haber conocido grandes personas que a hora son mis mejores amig@s, donde sabemos que la universidad nos sacó muchas lágrimas, felicidad desde el inicio hasta el fin de nuestra carrera profesional a Alexis, Silvana, Carla, Santiago, David, Juan, Kathe, Caro, Gabi y Beto.

Christian Rafael Quijia Quezada

ÍNDICE DE CONTENIDO

CERTIFICACIÓN	ii
AUTORÍA DE RESPONSABILIDAD	iii
AUTORIZACIÓN	iv
DEDICATORIA	v
AGRADECIMIENTO	vi
LISTADO DE FIGURAS	x
LISTADO DE CUADROS	xii
LISTADO DE ANEXOS	xiii
LISTADO DE ABREVIATURAS	xv
RESUMEN	xvi
ABSTRACT	xvii
1 CAPITULO I: INTRODUCCIÓN	1
1.1 Formulación de problema.....	1
1.2 Justificación del problema.....	2
1.3 Objetivos de la investigación.....	3
1.3.1 Objetivo General	3
1.3.2 Objetivos Específico	3
1.4 Marco Teórico	4
1.4.1 Generalidades de la enfermedad de Chagas.....	4
1.4.2 Transmisión de la enfermedad	4
1.4.3 Reservorios.....	5
1.4.4 Fases de la enfermedad	5
1.4.5 Patogénesis.....	6

1.4.6	Taxonomía de <i>Trypanosoma cruzi</i>	7
1.4.7	Etapas evolutivas del <i>Trypanosoma cruzi</i>	7
1.4.8	Ciclo de vida del <i>Trypanosoma cruzi</i>	9
1.4.9	Diversidad Genética de <i>Trypanosoma cruzi</i>	10
1.4.10	Correlación epidemiológica y aspectos clínicos de las 6 subdivisiones genéticas DTU's de <i>Trypanosoma cruzi</i>	12
1.4.11	Interacción <i>Trypanosoma cruzi</i> en célula hospedera	13
1.4.12	Cultivo y crecimiento del <i>Trypanosoma cruzi</i>	16
1.4.13	Utilización de modelo animal (<i>Mus músculos</i>) para <i>Trypanosoma cruzi</i> 17	
1.4.14	Histopatología de la enfermedad de Chagas	17
2	CAPITULO II: MATERIALES Y MÉTODOS	19
2.1	Obtención de aislados de <i>Trypanosoma cruzi</i>	19
2.1.1	Mantenimiento de epimastigote en medio de cultivo LIT	19
2.1.2	Crecimiento de formas epimastigotes	19
2.2	Cultivo de líneas celulares LLcMK ₂	20
2.2.1	Obtención de tripomastigotes.....	20
2.2.2	Producción de tripomastigotes a partir de infecciones celulares	20
2.2.3	Crioconservación de parásitos.....	21
2.2.4	Infección en células de mamífero (LLcMK ₂)	21
2.3	Análisis de curvas de parasitemia en ratones sensibles BALB/c	22
2.4	Análisis histopatológico en ratones sensibles BALB/c	22
2.5	Análisis estadístico	23
3	CAPITULO III: Resultados	24
3.1	Curvas de crecimiento de epimastigote en medio de cultivo LIT	24
3.2	Infección en células de mamífero (LLcMK ₂).....	25
3.2.1	Porcentaje de infección en células de mamífero (LLcMK ₂).....	25

3.2.2	Egreso de tripomastigote en células de mamífero (LLcMK ₂)	26
3.3	Curvas de parasitemia en ratones sensibles BALB/c	27
3.4	Porcentaje inflamatorio en músculo cardíaco y esquelético en fase la crónica de la enfermedad.....	28
4	CAPITULO IV: DISCUSIÓN	30
4.1	Curvas de crecimiento de epimastigotes en medio de cultivo LIT	30
4.2	Infección en células de mamífero (LLcMK ₂).....	31
4.2.1	Porcentaje de infección en células de mamífero (LLcMK ₂).....	31
4.2.2	Egreso de tripomastigote en células de mamífero (LLcMK ₂)	32
4.3	Curvas de Parasitemia en ratones sensibles BALB/c	33
4.4	Porcentaje inflamatorio en músculo cardíaco y esquelético en fase la crónica de la enfermedad.....	34
5	CAPITULO V: CONCLUSIONES	36
6	CAPITULO VI: RECOMENDACIONES.....	38
7	CAPITULO VII: BIBLIOGRAFÍA	39
8	CAPITULO VIII: ANEXOS.....	50

LISTADO DE FIGURAS

- Figura 1 :** Morfologías de los diferentes estadios del ciclo de vida de *Trypanosoma cruzi*. Se pueden apreciar representaciones esquemáticas de los estadios Epimastigote, Tripomastigota y Amastigota que componen el ciclo de vida del parásito 8
- Figura 2:** Esquema del ciclo de vida de *Trypanosoma cruzi*. 9
- Figura 3 :** Distribución geográfica de las 6 DTU's y su correspondencia con ciclos de transmisión asociados al ambiente silvestre y/o domiciliario 11
- Figura 4:** Resumen del modelo esquemático de las moléculas que participan en el proceso de interacción célula hospedera-parasito 14
- Figura 5:** Vista esquemática de las diversas fases de interacción de *T. cruzi* con las células de vertebrados..... 16
- Figura 6:** Diagrama del modelo clonal Histotropico de la enfermedad de Chagas. 18
- Figura 7:** In-vitro curvas de crecimiento de epimastigotes del grupo T.c. I (circulo), T.c. IV (triangulo) y T.c. V (cuadrado), en medio de cultivo axénico LIT. Los datos son desviación estándar (\pm S.D.) de 4 repeticiones por cada grupo estudiado. Asteriscos indican el punto del tiempo que muestra diferencias significativas entre grupos (*P <0,05). 24
- Figura 8:** In-vitro parásitos intracelulares amastigotes, porcentaje de infección en células mamíferas (LLCMK₂). 25
- Figura 9:** In-vitro egreso de tripomastigotes en células infectadas LLCMK₂ de T.c. I (Cuadrado Negro), T.c. IV (Cuadrado plomo) y T.c. V (Cuadrado Blanco). Los datos son desviación estándar (\pm S.D.) de 4 repeticiones

por grupo. Asteriscos indican el punto del tiempo que muestra diferencias significativas entre grupos de células infectadas (*P <0,05).

..... 26

Figura 10: In-vivo parasitemia en sangre de ratones Balb/c infectados con 10^4 Tripomastigotes de T.c. I y T.c. V durante la fase aguda (7, 14, 21, 28, 35, 42 y 49 días p.i). Los datos son desviación estándar (\pm S.D.) de 4 ratones por grupo de infección. Asteriscos indican punto de tiempo que muestra diferencias significativas entre grupos de ratones infectados (*P <0,05)..... 27

Figura 11: Análisis histopatológico de los músculos esqueléticos en inflamaciones (B, C, D,) y nidos de amastigotes (E) en 90 días pi. Y controles no infectados (A), se examinaron por microscopía de luz y se fotografió con un objetivo 40X. Áreas que presentan daño celular mayor o edema se indican mediante una flecha y nidos amastigotes con un asterisco. ... 29

LISTADO DE CUADROS

- Cuadro 1 :** Árbol derivado de las distancias genéticas entre los 13 aislamientos ecuatorianos y las 4 poblaciones de referencia *T. cruzi*. Entre paréntesis, el anfitrión de los aislados de Ecuador o de "referencia" para las poblaciones de referencia..... 11
- Cuadro 2:** Aspectos clínicos y epidemiológicos de las 5 subdivisiones genéticas DTU's de *Trypanosoma cruzi*..... 12
- Cuadro 3 :** Formas clínicas entre los tres diferentes genotipos de diez cepas de *Trypanosoma cruzi* presentes en Ecuador..... 13

LISTADO DE ANEXOS

Anexo 1. Preparación del medio de cultivo líquido LIT.....	50
Anexo 2. Preparación de medio de cultivo DMEM 10 % DE FBS (pH 7,2).....	50
Anexo 3. Preparación de PBS 1X en 1000 ml.	51
Anexo 4. Preparación de GIEMSA.....	51
Anexo 5. Infección de parásito en ratones sensibles BALB/c.....	51
Anexo 6: Recolección de corazón y cuádriceps	51
Anexo 7: Preparación de paraformaldehído 4 % (50 ml, pH 7,2).....	52
Anexo 8: Prueba de ANOVA basada para un experimento de medias no repetitivas. Examen estadístico para analizar el crecimiento cinético del Trypanosoma cruzi de los tres grupos filogenéticos en forma epimastigote en medio de cultivo LIT, hasta el día 30.....	52
Anexo 9: Prueba de significancia de Tukey. Realizado para analizar la diferencia en el crecimiento cinético del Trypanosoma cruzi de los tres grupos filogenéticos en forma epimastigote en medio de cultivo LIT, hasta el día 30.....	52
Anexo 10: Prueba de ANOVA basada para un experimento de medias no repetitivas. Examen estadístico para analizar el egreso del tripomastigote de los tres grupos filogenéticos en células de mamífero (LLCMK₂), hasta los 25 días de post- infección.....	53

- Anexo 11: Prueba de significancia de Tukey.** Realizado para analizar la diferencia el egreso del tripomastigote de los tres grupos filogenéticos en células de mamífero (LLCMK₂), hasta los 25 días de post- infección. 53
- Anexo 12: Promedio de infecciones in-vitro.** Forma amastigote de los tres grupos filogenéticos en células de mamífero (LLCMK₂), en 24 y 48 horas de post- infección. 54
- Anexo 13: Prueba de ANOVA basada para un experimento de medias no repetitivas.** Examen estadístico para analizar la diferencia de promedio de infecciones in-vitro de los tres grupos filogenéticos en células de mamífero (LLCMK₂), en 24 y 48 horas de post- infección. 54
- Anexo 14: Prueba de significancia de Tukey.** Realizado para analizar la diferencia de promedio de infecciones in-vitro de los tres grupos filogenéticos en células de mamífero (LLCMK₂), en 24 y 48 horas de post- infección. 54
- Anexo 15: Prueba de ANOVA basada para un experimento de medias no repetitivas.** Examen estadístico para analizar las parasitemias de los tres grupos filogenéticos en ratones sensibles BALB/c durante 56 días de post- infección. 55
- Anexo 16: Prueba de significancia de Tukey.** Realizado para analizar la diferencia de parasitemias de los tres grupos filogenéticos en ratones sensibles BALB/c durante 56 días de post- infección. 55

LISTADO DE ABREVIATURAS

T.c.:	<i>Trypanosoma cruzi</i> .
LLcMK₂:	Células de riñón de mono (Rhesus monkey kidney epithelial cells).
LIT:	Infusion de hígado (Liver Infusion Tryptose).
DTU:	Unidad de Tipificación Discreta (Discrete Typing Units).
T.c.-Tox:	Péptido homólogo al componente C9 del complemento.
TS:	Transialidasas de superficie.
DMEM:	Medio de cultivo celular modificado por Dulbecco (Dubelcco's modified Eagle médium).
p.i.:	Post-infección.
HE:	Hematoxilina y eosina.
ANOVA:	Análisis de varianza de un solo factor.
FBS:	Suero fetal bovino (fetal bovine serum)
PBS:	Buffer salino con fosfato (phosphato buffered saline)
DTe:	Tiempo requerido del epimastigote
gp:	Glicoproteína

RESUMEN

La enfermedad de Chagas es causada por *Trypanosoma cruzi* y transmitida por insectos de la familia Reduviidae. En Ecuador, aproximadamente, 3.8 millones de personas son vulnerables a esta infección, y más de 200.000 personas están infectadas. Trabajos anteriores han permitido caracterizar perfiles filogenéticos de diversas cepas ecuatorianas de *T. cruzi*, demostrando que existe una gran variabilidad genética del parásito. La posible correlación entre la variabilidad genética y el comportamiento infecciosa-patológico de estas cepas aún permanecen inexploradas. Por lo tanto, el objetivo de este estudio es determinar las diferencias entre la virulencia y daños patológicos inducidos por los diferentes grupos filogenéticos ecuatorianos. Para este estudio se utilizó una cepa representativa de cada grupo filogenético (T.c. I, T.c. IV, T.c. V). Los parámetros biológicos estudiados fueron (1) *in-vitro*: el crecimiento y la capacidad de infección en célula de mamífero (LLcMK₂), y (2) *in-vivo*: análisis de parasitemia y procesos inflamatorios de la fase crónica en ratones sensibles BALB/c. Como resultados obtuvimos que las formas epimastigotes del grupo T.c. V tiene un crecimiento muy bajo comparado a los grupos T.c. I y T.c. IV. Además, el grupo T.c. I presenta una tasa de infección del 14 % en células mamíferas comparado con el grupo T.c. IV con un 7 %. También T.c. I presenta un mayor número de tripomastigotes extracelulares. Por otra parte, la parasitemia del grupo T.c. I fue superior que el grupo T.c. V, mientras que el grupo T.c. IV no se detectó parásitos. Por último, los análisis histopatológicos muestran que los procesos inflamatorios en cuádriceps son más significativos para el grupo de T.c. V comparado con T.c. I y T.c. IV. En conclusión, existen importantes diferencias en la virulencia y patogenicidad entre estos tres grupos filogenéticos tanto *in-vitro* como *in-vivo*. Esto sugiere que la patogenicidad de la enfermedad de Chagas es altamente dependiente de cada grupo de *T. cruzi*.

PALABRAS CLAVE:

- **CHAGAS**
- **ECUADOR**
- **INFECTIVIDAD**
- **VIRULENCIA**
- **PATOGENICIDAD.**

ABSTRACT

Chagas disease is caused by *Trypanosoma cruzi* and transmitted by Reduviidae insects. In Ecuador, approximately 3.8 million people are vulnerable to this infection, and more than 200,000 are believed to be infected. Previous work has allowed us to characterize the phylogenetic profiles of a number of Ecuadorian *T. cruzi* strains, showing that genetic variability of the parasite in the country is greater than previously thought. The possible correlation between the genetic variability and infectious-pathological behavior of these strains remains unexplored. Therefore, the aim of this study is to determine the differences between virulence and pathological damages induced by different phylogenetic groups within Ecuadorian isolates. A representative Ecuadorian strain of each phylogenetic group (T.c. I, T.c. IV and T.c. V) was used for this study. Biological parameters studied were (1) *in-vitro* growth and infectivity in LLcMK₂ mammalian cells, and (2) *in-vivo* analysis of parasitemia and chronic inflammatory phase in sensitive mice BALB/c. We report that epimastigotes belonging to the T.c. V group have a lower growth rate than those belonging to the T.c. T.c. IV groups and me. In addition, the T.c. I group presents a 14% infection rate in mammalian cells compared to 7% for T.c. IV. T.c. I mammalian cell cultures also yield a greater number of extracellular trypomastigotes. Moreover, parasitemia from the T.c. I strain was higher than that displayed by the T.c. V strain while no parasites were detected with the T.c. IV strain. Finally, histopathological analyzes showed that inflammatory processes in quadriceps are more significant for the T.c. V strain than the T.c. T.c. IV strains and I. In conclusion, the virulence and pathological differences between strains of the three phylogenetic groups analyzed are important as revealed by both *in-vitro* and *in-vivo* assays. This strongly suggests that the pathogenicity of Chagas disease is highly dependent on *T. cruzi* strains.

KEYWORDS

- CHAGAS
- ECUADOR
- INFECTIVITY
- VIRULENCE
- PATHOGENICITY

1 CAPITULO I: INTRODUCCIÓN

1.1 Formulación de problema

La infección por *Trypanosoma cruzi*, agente causal de la enfermedad de Chagas o Tripanosomiasis Americana es una de las patologías endémicas de América latina y en el Ecuador constituye un importante problema de salud pública. Esta enfermedad es transmitida por insectos hematófagos perteneciente a la familia *Reduviidae* (WHO, 2012), siendo *Rhodnius ecuadoriensis*, uno de los vectores más importantes en la transmisión de la enfermedad de Chagas en el Ecuador debido, a su amplia distribución y capacidad de adaptación a diversos ambientes (Grijalva et al., 2015; Villacis, Arcos-Teran, & Grijalva, 2008).

Esta enfermedad presenta un curso clínico variable que inicia una fase aguda asintomática, caracterizado por una alta parasitemia. La enfermedad avanza a una fase crónica, caracterizada por la ausencia de parásitos en la sangre, presentando una alta tasa de morbilidad y mortalidad; incluyendo manifestaciones clínicas que van desde la ausencia total de síntomas hasta problemas cardíacos, esofágicos y digestivos (Rassi, Rassi, & Marin-Neto, 2010). La habilidad del parásito para sobrevivir a la fase aguda y avanzar hacia la fase crónica e invadir determinados órganos depende tanto de factores genéticos del parásito como del hospedador (Macedo, Machado, Oliveira, & Pena, 2004; Tibayrenc et al., 1993).

Por otro lado métodos bioquímicos y moleculares han permitido clasificar a *T. cruzi* en seis grandes linajes genéticos T.c. I a T.c. VI (Zingales et al., 2009). Siendo en Ecuador, han permitido aislar cepas de *T. cruzi* en diferentes zonas endémicas a partir de pacientes e insectos vectores, La caracterización de estas cepas ecuatorianas circulantes en diferentes zonas endémicas de la enfermedad han demostrado por primera vez demostrar la presencia de tres grupos de *T. cruzi* (T.c. I, T.c. IV y T.c. V) filogenéticamente presentes en el Ecuador. Estos estudios demuestran que en Ecuador existe una alta variabilidad genética de *T. cruzi* en nuestro país (Garzón et al., 2002).

Actualmente, en Ecuador no existen trabajos de investigación que combinen la variabilidad genética de *T. cruzi* y las diferencias de infectividad y patogenicidad de cepas ecuatorianas.

1.2 Justificación del problema

La enfermedad de Chagas Tripanosomiasis Americana, causada por *Trypanosoma cruzi*, sigue siendo un grave problema importante de salud pública en muchas zonas de América Latina, afectando a 8-9 millones de personas (Hotez, Bottazzi, Franco-Paredes, Ault, & Periago, 2008). Ecuador aproximadamente 300.000 personas están afectadas y 6,2 millones están en riesgo de infección (PAHO, 2006). De acuerdo a la Organización Mundial de la Salud (OMS), ésta enfermedad constituye en la actualidad la tercera enfermedad tropical más relevante tras la malaria y la esquistosomiasis (Moncayo, 1999; WHO, 2012).

La enfermedad de Chagas presenta un curso clínico variable que inicia una fase aguda asintomática, caracterizado por una alta parasitemia. La enfermedad avanza a una fase crónica, caracterizada por la ausencia de parásitos en la sangre, presentado una alta tasa de morbilidad y mortalidad; incluyendo manifestaciones clínicas que van desde la ausencia del total de síntomas hasta problemas cardiacos, esofágicos y digestivos (Rassi et al., 2010). La habilidad del parásito para sobrevivir a la fase aguda y avanzar hacia la fase crónica e invadir determinados órganos depende tanto de factores genéticos del parásito como del hospedador (Macedo et al., 2004; Tibayrenc et al., 1993). Por esto, diversas investigaciones han estudiado los mecanismos de patogénesis con énfasis en la diversidad genética del parásito y su posible relación con el desarrollo de los distintos cuadros clínicos de esta enfermedad (Macedo et al., 2004).

Estudios bioquímicos y moleculares han permitido clasificar a *T. cruzi* en seis grandes linajes genéticos T.c. I a T.c. VI (Zingales et al., 2009). En este contexto varios son los trabajos de investigación utilizando modelos de infecciones experimentales con *T. cruzi* en especial el modelo murino en donde se ha medido varios parámetros biológicos (parasitemia, histopatología, inmunosupresión, mortalidad). Reportado la presencia de diferencias biológicas y de manifestaciones fenotípicas con cepas genéticamente distintas (Garzón et al., 2002; Revollo et al., 1998; Toledo et al., 2002).

En el Ecuador trabajos anteriores han permitido aislar cepas de *T. cruzi* en diferentes zonas endémicas de la enfermedad de Chagas en Ecuador, a partir de pacientes e insectos vectores, trabajos que han permitido por primera vez la caracterización filogenética de cepas circulantes en el Ecuador. Demostrando que en Ecuador existe una alta variabilidad genética de *T. cruzi* (Garzón et al., 2002).

Este único trabajo en Ecuador estuvo limitado a la caracterización filogenética, es por eso que el presente estudio está enfocado en la necesidad de realizar la caracterización biológica e histopatológica de estas cepas de *T. cruzi* y determinar los distintos grados de virulencia de cepas ecuatorianas que están circulando en las zonas endémicas de la enfermedad de Chagas en nuestro país.

1.3 Objetivos de la investigación

1.3.1 Objetivo General

La caracterización biológica e histopatológicamente de las diferentes cepas de *Trypanosoma cruzi* aisladas en el Ecuador, y observar la implicación de la diversidad genética del parásito en la virulencia y patogenicidad en el modelo murino.

1.3.2 Objetivos Específico

- Comparar la capacidad del crecimiento de epimastigotes genéticamente distintos en medio de cultivo LIT (Liver Infusion Tryptose).
- Diferenciar el poder infeccioso de los parásitos genéticamente distintos a infectar en células de mamífero (LLcMK₂).
- Estudiar la capacidad de infección de los parásitos genéticamente distintos en ratones sensibles BALB/c.
- Evaluar el porcentaje inflamatorio en músculo cardíaco y esquelético en ratones crónicos infectados con los diferentes grupos genéticos del parásito.

1.4 Marco Teórico

1.4.1 Generalidades de la enfermedad de Chagas

La enfermedad de Chagas o Tripanosomiasis Americana fue descubierta en 1909, por el investigador brasilero Carlos Chagas en Minas Gerais, Brasil (Kropf, 2008). Esta enfermedad es causada por *Trypanosoma cruzi*, la cual sigue siendo un grave problema importante de salud pública en muchas zonas de América Latina, afectando a 8-9 millones de personas (Hotez et al., 2008). En Ecuador aproximadamente a 300.000 personas padecen la enfermedad y 6,2 millones se encuentran en riesgo de infección (PAHO, 2006) . De acuerdo a la Organización Mundial de la Salud (OMS), ésta enfermedad constituye en la actualidad la tercera enfermedad tropical más relevante tras la malaria y la esquistosomiasis (Moncayo, 1999; WHO, 2012) .

1.4.2 Transmisión de la enfermedad

La enfermedad de Chagas puede ser transmitido de diversas maneras: por insectos vectores (triatominos), o a través de transfusión de sangre, de manera congénita y oral (WHO, 2012). La transmisión vectorial es la más común y causa el 80 -90 % de las infecciones por *T. cruzi* y la transfusión de sangre ocasionan del 5 % al 20 % de los casos (Dias & Schofield, 1999).

Otra vía de transmisión se puede deber por vía congénita, es decir, cuando madres infectadas transmiten la infección a sus hijos durante el embarazo o parto (Franco-Paredes, Bottazzi, & Hotez, 2009) .según la Organización Mundial de la Salud , por año existen aproximadamente 15.000 casos de recién nacidos infectados con *T. cruzi* por vía congénita. Finalmente, la vía de transmisión oral ocurre por el consumo de alimento contaminados con heces de triatominos; sin embargo, este caso no es muy frecuente (Schofield & Kabayo, 2008).

1.4.3 Reservorios

Esta enfermedad es transmitida por insectos hematófagos perteneciente a la familia *Reduviidae*, (WHO, 2012), Por tanto, este vector puede reproducirse y alimentarse en su reservorio natural (los más comunes son el armadillo y los marsupiales), también existe otros reservorios como son: los humanos infectados, animales domésticos y animales salvajes. Siendo así, la coexistencia de dos ciclos importantes que son:

1.4.3.1 Ciclo selvático

Este ciclo se relaciona con las especies silvestres y los insectos triatóminos que habitan en ambientes selváticos, por lo tanto los humanos y los animales domésticos se infectan en contacto con estos insectos en su hábitat natural.

1.4.3.2 Ciclo doméstico

Esta relacionado con algunos insectos vectores que han colonizado diversos lugares como adobes primitivos, pastos y casas con techos de paja, lo que ocasionó la transmisión entre humanos e insectos. (Kirchhoff, 1996) .

1.4.4 Fases de la enfermedad

La enfermedad de Chagas tiene tres fases: aguda, asintomática y crónica. La fase aguda puede ocurrir a cualquier edad y dura aproximadamente dos meses a partir de la infección inicial. Durante este tiempo, un gran número de parásitos está presente en la sangre de los pacientes (Abad-Franch, 2003). Sin embargo, algunos pacientes pueden ser asintomáticos dependiendo del sitio de inoculación (WHO, 2012) .

Los pacientes que presentan síntomas manifiestan fiebre, dolor de cabeza, mialgia, pérdida de peso, etc., (WHO, 2012). Menos del 50 % de los pacientes presentan un nódulo cutáneo en el sitio de ingreso del parásito, conocido como chagoma o un edema en la zona ocular conocido como signo de Romana (Abad-Franch, 2003) . Posteriormente, ocurre la fase crónica que se presenta después de 10 a 20 años, en la cual, algunos parásitos se encuentran en los tejidos, mientras que la mayoría han sido eliminados por el sistema inmune. Esta fase presenta distintas formas clínicas: indeterminada, cardíaca y digestiva (WHO, 2012).

En la forma indeterminada, los pacientes no presentan síntomas. La mayoría de pacientes (-70%) presentan esta forma de enfermedad. Por otro lado, alrededor del 30 % de pacientes desarrollan daños cardíacos, los cuales pueden ocurrir 10-20 años después de la infección. La forma cardíaca es el resultado más común de la enfermedad (WHO, 2012).

Por otro lado, los pacientes crónicos también pueden presentar daños digestivos y nerviosos (Manoel-Caetano Fda & Silva, 2007) . La forma digestiva, presente en el 10 % de los pacientes chagásica (WHO, 2012), produce desordenes de absorción secreciones anormales y daños en el aparato digestivo principalmente en esófago y colon (Manoel-Caetano Fda & Silva, 2007).

1.4.5 Patogénesis

Una vez que los tripomastigotes de *T. cruzi* han entrado al hospedero mamífero, los parásitos se diseminan por todo el cuerpo, ubicándose principalmente en los nódulos linfáticos, a partir de los cuales migran a diferentes partes del cuerpo por el torrente sanguíneo (WHO, 2012). En humano, *T. cruzi* es capaz de invadir y multiplicarse dentro de varios tipos de células como macrófagos, fibroblastos, músculos estriados y tejido blandos. Como productos de la infección, puede producirse inflamación severa. Acompañado de necrosis en células parasitadas y no parasitadas (Z. A. Andrade, 1999) ; por esto se ha sugerido que los daños patológicos son resultados de la respuesta inmune (Ben Younes-Chennoufi et al., 1988) y que la patogénesis de esta enfermedad presenta dos lesiones inflamatorias básicas: una focal, asociado a la presencia del parásito, y otra difusa, relacionada más a la reacción autoinmune del organismo (Z. A. Andrade, 1999). Por otra parte, otra forma de explicar la patogénesis de la enfermedad de Chagas, es la hipótesis de persistencia del parásito; esta hipótesis propone que el daño de los tejidos durante la enfermedad es el resultado de la persistencia de los parásitos dentro de la célula, lo que genera síntomas severos (Teixeira, Guimaro, & Santos, 2006).

1.4.6 Taxonomía de *Trypanosoma cruzi*

La clasificación del *Trypanosoma cruzi* está basada en un conjunto de criterios que incluye el ciclo de vida, morfología, el desarrollo dentro del invertebrado y la relación parásito- hospedero.

La clasificación taxonómica de *Trypanosoma cruzi* sugerida por (Hoare, 1972) es:

Subreino	Protozoa
Phylum	Sarcomastigophora
Clase	Zoomastigophorea
Orden	Kinetoplastida
Familia	Trypanosomatidae
Género	<i>Trypanosoma</i>
Subgénero	<i>Schizotrypanum</i>
Especie	<i>cruzi</i>

1.4.7 Etapas evolutivas del *Trypanosoma cruzi*

El *T. cruzi* sufre tres distintas etapas evolutivas morfológicas y fisiológicas durante su ciclo de vida, estas etapas son identificadas en relación a la posición del cinetoplasto con el núcleo celular y el flagelo (Brenner, 1965) que son:

a) La forma **amastigotes** mide aproximadamente entre 3 a 5 μm de diámetro, se replica dentro del hospedero vertebrado y es capaz de transformarse en forma epimastigote en el intestino del insecto vector, posee un flagelo corto, tiene un gran núcleo cerca del cual se encuentra el cinetoplasto en forma de bastón (Carvalho, Ferreira, Coimbra, Rosestolato, & De Souza, 1999; Fernandes, Neira, Ferreira, & Mortara, 2006; Mortara, 1991) . Se puede encontrar en el interior de muchos tipos de células, como células de fibras musculares estriadas, tanto cardíacas como esqueléticas. Algunas cepas tienen afinidad en el sistema nervioso que pueden invadir células gliales como las neurales (L. Reyes, 1991).

b) La forma **epimastigote** se replica en el intestino medio del insecto vector, se caracteriza por poseer una forma alargada, cerca de 20 a 40 μm de longitud. El cinetoplasto tiene una forma de bastón y localizado en la parte anterior-lateral al núcleo, durante este estadio tiene la capacidad de multiplicarse en cultivo axénico (de Souza, de Carvalho, & Barrias, 2010) . Su multiplicación es muy activa realizado por división binaria longitudinal, permanecen agrupados formando enormes rosetas con las extremidades flageladas dirigidas hacia el centro. Se desarrollan a temperaturas ambientes, no soportan temperaturas de hospederos vertebrados y son lisados en contacto con suero normal de cobayo a 37 °C(L. Reyes, 1991).

c) Forma **trypomastigotes** es la más infectiva en varios tipos celulares, posee cerca de 25 μm de longitud y 2 μm de diámetro, el cinetoplasto tiene forma alargada y está localizado en la parte posteriormente al núcleo, esta forma se puede encontrar en el ciclo intracelular, en el medio extracelular o libre en la circulación sanguínea del hospedero vertebrado y en la parte posterior terminal del intestino del insecto vector, exclusivamente en sus heces (De Souza, 2002). En la figura 1 indica los tres estadios morfológicos.

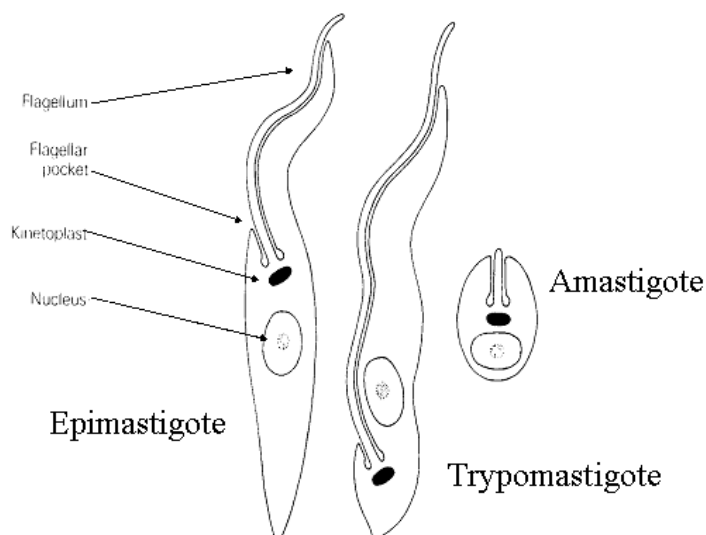


Figura 1:

Morfologías de los diferentes estadios del ciclo de vida de *Trypanosoma cruzi*. Se pueden apreciar representaciones esquemáticas de los estadios Epimastigote, Trypomastigote y Amastigote que componen el ciclo de vida del parásito

Fuente: (Teixeira et al., 2006)

1.4.8 Ciclo de vida del *Trypanosoma cruzi*

Estos triatomíneos tienen condiciones hematófago obligado, es decir; necesitan sangre de un vertebrado para completar su ciclo de vida (Guzmán-Marín Eugenio, 1990), por lo tanto los insectos vectores se contagian del parásito cuando se alimentan de sangre de humanos o animales infectados; los tripanosomas que son ingeridos a través de la probóscide se transforman en epimastigotes cortos; los cuales se multiplican por división binaria, desarrollándose a formas largas, en la parte posterior del intestino medio del triatomíneo. En un periodo de ocho a diez días, formas metacíclicas o pequeños tripanosomas se ubican en el recto del vector y salen en las heces. Estas formas parasitarias son las que infectan al hospedero cuando éstos se frotan en la picadura causada por el insecto (Aguilar, Abad-Franch, Racines, & Paucar, 1999), en la figura 2 se indica el ciclo de vida del *T. cruzi*.

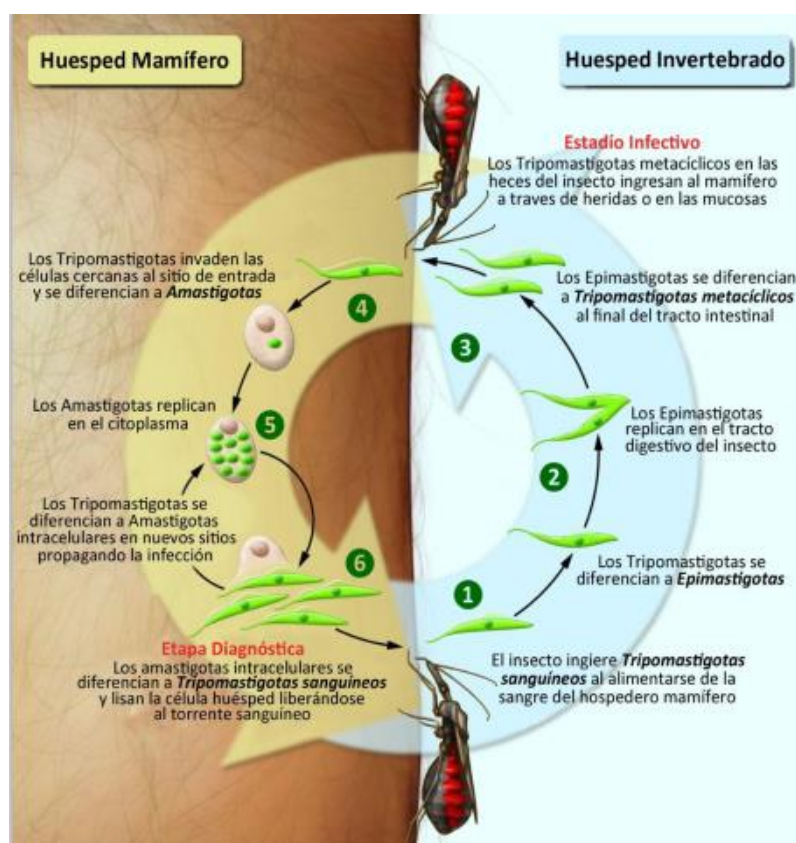


Figura 2:

Esquema del ciclo de vida de *Trypanosoma cruzi*.

Fuente: Stuart et al., 2008

1.- Se inicia el ciclo cuando el insecto ingiere parásitos al alimentarse de la sangre de un individuo infectado. Estos parásitos se encuentran en el estadio Tripomastigote sanguíneo, no replicativo. 2.- Al avanzar por el tracto digestivo los tripomastigotes se diferencian a epimastigotes, que proliferan en el tracto medio del intestino. 3.- Cuando los epimastigotes alcanzan la ampolla rectal estos son estimulados a diferenciarse a Tripomastigotes metacíclicos. Estos tripomastigotes son depositados con las heces del insecto e ingresan al nuevo individuo a través de heridas, como la picadura del insecto, o a través de superficies mucosas. 4.- Los tripomastigotes ingresan al citoplasma de células en la cercanía del sitio de entrada y se diferencian a Amastigotes. 5.- Los Amastigotes son capaces de proliferar en el ambiente intracelular. 6.- Los amastigotes se diferencian a tripomastigotes sanguíneos y luego de la lisis de la célula hospedera estos son liberados al torrente sanguíneo. En el sistema circulatorio los tripomastigotes colonizan nuevos tejidos logrando una infección a nivel sistémico. El ciclo se cierra cuando nuevamente un insecto ingiere estos tripomastigotes al alimentarse con la sangre del huésped mamífero (Stuart et al., 2008).

1.4.9 Diversidad Genética de *Trypanosoma cruzi*

Las diferentes poblaciones de clones de parásitos se obtienen por el vector o huéspedes mamíferos, que actúan como reservorio de los *T. cruzi* (Macedo et al., 2004) ; por ejemplo los pacientes de zonas endémicas son infectados por diferentes triatomíneos, lo que conduce a las formaciones de poblaciones multiclónales de *T. cruzi*, e induce distintas características genéticas, biológicas y de comportamiento en el reservorio mamífero (Z. A. Andrade, 1999) .

Los primeros estudios sistemáticos de *T. cruzi* se iniciaron por (M. A. Miles, Toye, Oswald, & Godfrey, 1977) describieron tres clases de linajes enzimáticos que fueron designados (Z1, Z2, Z3), estos estudios epidemiológicos demostraron que Z1 y Z3 se asociaron con el ciclo silvestre y Z2 con el ciclo domiciliario (M. Miles, Lanham, Souza, & Pova, 1980).

La nomenclatura de *T. cruzi* ha sido adoptado en seis Unidades de Tipificación Discretas (DTU) nombradas como *T. cruzi I* (T.c. I), *T. cruzi II* (T.c. II), *T. cruzi III* (T.c. III), *T. cruzi IV* (T.c. IV), *T. cruzi V* (T.c. V) y *T. cruzi VI* (T.c. VI). Estas clasificaciones están basadas en estudios con diferentes marcadores moleculares y de caracterización biológicas (Zingales et al., 2009).

La figura 3 muestra la distribución geográfica de las 6 DTU's y su correspondencia con los ciclos de transmisión asociados al ambiente silvestre y/o domiciliario (Herrera et al., 2007) .

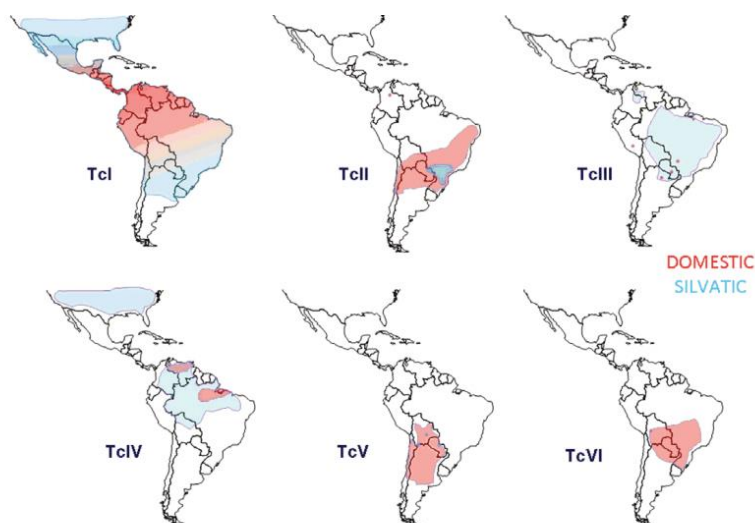
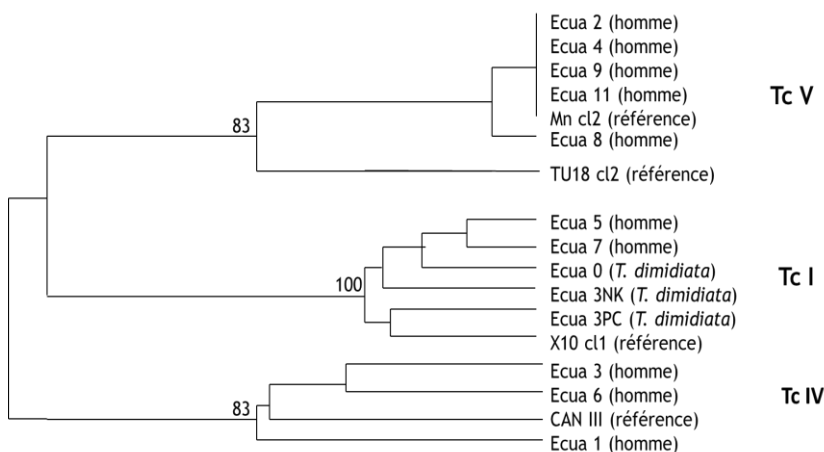


Figura 3: Distribución geográfica de las 6 DTU's y su correspondencia con ciclos de transmisión asociados al ambiente silvestre y/o domiciliario

En Ecuador se ha encontrado diez isoenzimas genotípicas diferentes y cada una de ellas dentro de tres unidades de tipificación discretas (DTU), como se indica en el siguiente cuadro 1 (Garzón et al., 2002) :

Cuadro 1: Árbol derivado de las distancias genéticas entre los 13 aislamientos ecuatorianos y las 4 poblaciones de referencia *T. cruzi*. Entre paréntesis, el anfitrión de los aislados de Ecuador o de "referencia" para las poblaciones de referencia.



Fuente: (Garzón et al., 2002)

1.4.10 Correlación epidemiológica y aspectos clínicos de las 6 subdivisiones genéticas DTU's de *Trypanosoma cruzi*

Debido a la variación genética de *T. cruzi*, no existe una correlación clara con cualquier patrón de variación étnica, genética humana, o ambiental, pero hasta ahora es posible correlacionar aspectos clínicos y epidemiológicos en las seis subdivisiones genéticas DTU's por el cual se presentan en el siguiente cuadro (M. A. Miles et al., 2009).

Cuadro 2:

Aspectos clínicos y epidemiológicos de las 5 subdivisiones genéticas DTU's de *Trypanosoma cruzi*

DTU	Ciclo de transmisión	Distribución geográfica de la enfermedad	Aspectos Clínicos
T.c. I	Predominante en ciclo silvestre	Región Amazona	Por lo general asociados con la enfermedad de Chagas crónica en Venezuela y Colombia; Asociado con la transmisión oral y casos agudos severos en Brasil;
T.c. II	Predominante en ciclo doméstico y raro en selvático	Principalmente en América del Sur	En Brasil principal causa de la enfermedad aguda y crónica megaesófago y megacolon
T.c. III	Predominante en ciclo selvático y raro en domestico		En raras ocasiones causa la enfermedad de Chagas
T.c. IV	Predominante en ciclo selvático y raro en domestico	Venezuela y región Amazona	Pocas cepas conocidas, se han aislado de los seres humanos. Posiblemente asociado con la transmisión oral y casos agudos severos en Brasil
T.c. V	Predominante en ciclo doméstico y raro en selvático	Sur de América	Enfermedad severa aguda y crónica: megaesófago y megacolon.
T.c. VI	Predominante en ciclo doméstico y raro en selvático	Sur de América	Posiblemente asociada con la enfermedad de Chagas aguda y crónica.

Fuente: (M. A. Miles et al., 2009)

En Ecuador un estudio anterior ha permitido analizar formas clínicas entre las tres unidades de tipificación discretas (DTU) en el siguiente cuadro se presenta (Garzón et al., 2002):

Cuadro 3:

Formas clínicas entre los tres diferentes genotipos de diez cepas de *Trypanosoma cruzi* presentes en Ecuador

<i>Trypanosoma cruzi</i>		<i>Patología</i>
<i>T. cruzi V</i>	<i>Ecua 2</i>	<i>Asintomático</i>
	<i>Ecua 4</i>	<i>Patología digestivo</i>
	<i>Ecua 9</i>	<i>Patología cardiaca y digestiva</i>
	<i>Ecua 11</i>	<i>Patología digestivo</i>
	<i>Ecua 8</i>	<i>Patología cardiaca</i>
<i>T. cruzi I</i>	<i>Ecua 5</i>	<i>Patología cardiaca y digestiva</i>
	<i>Ecua 7</i>	<i>Asintomático</i>
	<i>Ecua 0</i>	<i>Vector Triatoma dimidiata</i>
	<i>Ecua 3 NK</i>	<i>Vector Triatoma dimidiata</i>
	<i>Ecua 3 PC</i>	<i>Vector Triatoma dimidiata</i>
<i>T. cruzi IV</i>	<i>Ecua 3</i>	<i>Patología cardiaca y digestiva</i>
	<i>Ecua 6</i>	<i>Patología cardiaca y digestiva</i>
	<i>Ecua 1</i>	<i>Asintomático</i>

Fuente: (Garzón et al., 2002)

1.4.11 Interacción *Trypanosoma cruzi* en célula hospedera

Los primeros pasos del proceso de interacción del *Trypanosoma cruzi* y célula hospedadora, se debe a tres diversas etapas: la adhesión y reconocimiento, señalización, y la invasión. Además, en los estudios de interacción de *T. cruzi* y célula huésped, se debe tener en cuenta: (i) la cepa *T. cruzi* utilizada en los estudios, (ii) la etapa de desarrollo que se utilizó (Yoshida & Cortez, 2008) , (iii) si la forma tripomastigote utilizado es delgado o grueso, (iv) y que células les albergan (De Souza, 2002) . Por lo tanto, es posible prever que tipo de mecanismos implica en el reconocimiento, la señalización, y la invasión.

Una de las etapas es el reconocimiento, que consiste en tomar en cuenta las moléculas que están presentes en la superficie de la célula huésped y el parásito (Figura 4). Por lo tanto no se puede excluir que las moléculas secretadas por el parásito, también pueden desempeñar algún papel en este proceso (de Souza et al., 2010).

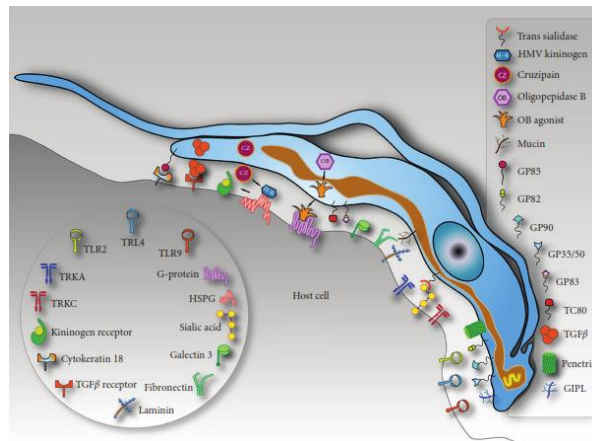


Figura 4:

Resumen del modelo esquemático de las moléculas que participan en el proceso de interacción célula hospedera-parásito

Este modelo indica que la etapa de reconocimiento es un proceso que depende de la interacción de membrana celular y del parásito, por ejemplo existen algunas glicoproteínas (gp) del tripomastigote, que se expresan en diferentes cepas, tales como gp 90, gp 82, gp 30, gp 35/50 entre otras moléculas presentes en la superficie. Siendo así, que esta unión desencadena vías de señalización que pueden resultar o no en la internalización eficiente parásito.

Fuente: (de Souza et al., 2010)

Con respecto a la variación morfológica del tripomastigote, se han verificado que algunas cepas presentan formas delgadas y gruesas. (Brenner, 1965). Por lo tanto, al realizar una infección en ratones se ha demostrado que la forma delgada desaparece rápidamente localizándose dentro de la célula o son destruidos, mientras que las formas grandes permanecen en la circulación sanguínea (Brenner, Tafuri, & Maria, 1969) . Esta predominancia delgada y gruesa, llevó (Brenner, 1973) a proponer el término “cepas polares”, ya que observo que dos diferentes cepas Y y CL presentan diferencia en la parasitemia, mortalidad, tropismo tisular y resistencia a la quimioterapia o la susceptibilidad.

Otra característica del *T. cruzi* en fase tripomastigotes, es la capacidad de invadir y proliferar en cualquier línea celular de mamífero (Burleigh & Andrews,

1995; de Araujo-Jorge, 1989; De Araujo-Jorge, Barbosa, & Meirelles, 1992). Entre los mecanismos más comunes utilizados del tripomastigote para invadir los macrófagos es la fagocitosis. Y para la invasión de las células no fagocitadas es por medio de endocitosis con o sin formación inicial de lisosomas (Tanowitz, Wittner, Kress, & Bloom, 1975) .

Independientemente del mecanismos de entrada del ciclo intracelular del *T. cruzi*, este comienza en el momento de invasión del tripomastigotes en la célula hospedera, donde termina con el encerramiento del parasito por medio de vacuolas parasitóforas (Rodriguez, Afchain, Santoro, Bazin, & Capron, 1983). Dado que el parasito se encuentra en un medio acido esto provoca la secreción de porina, por lo tanto secreta un factor denominado T.c.-Tox, que es un péptido homologo al componente C9 del complemento (de Souza et al., 2010) , a la vez libera transialidasas de superficie (TS) que elimina residuos de ácidos siálico de la membrana de la vacuola , permitiendo que el parásito lise la membrana de la vacuola y quede libre en el citoplasma de la célula hospedera (Andrews & Whitlow, 1989).

Dentro del citoplasma la forma tripomastigotes se transforma en amastigotes, después de una fase estacionaria comienza una serie de divisiones binarias hasta que se llena todo el citoplasma de la célula huésped. Al final del ciclo de multiplicación, se reinicia una diferenciación y se forma el tripomastigotes, que en un momento dado rompe la membrana de la célula huésped y gana el medio extracelular, siendo capaz de infectar nuevas células (De Souza, 2002) .En la figura 5 se indica las diversas fases de la interacción de *T. cruzi* con las células de vertebrados.

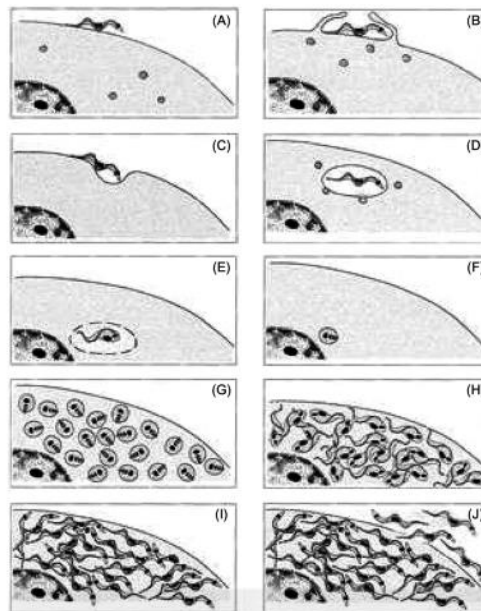


Figura 5:

Vista esquemática de las diversas fases de interacción de *T. cruzi* con las células de vertebrados.

Fuente: (De Souza, 2002)

(A) El parásito se adhiere a la membrana de la célula huésped; (B) Internalización del parásito a través de pseudópodos (C) superficie celular; (D) El parásito dentro de la vacuola parasitófora y fusión con los lisosomas; (E) El cambio de la morfología tripomastigote y desintegración de la membrana de la vacuola parasitófora; (F) Liberación del amastigote en el citoplasma de la célula huésped; (G) Multiplicación de los amastigotes; (H) Proceso de diferenciación de amastigote a tripomastigote; (I) Tripomastigotes en el citoplasma de la célula huésped; (J) Ruptura de la célula huésped y la liberación de tripomastigotes al espacio intercelular (De Souza, 2002).

1.4.12 Cultivo y crecimiento del *Trypanosoma cruzi*

El *Trypanosoma cruzi* en fase epimastigote se puede desarrollar medio líquido complejo denominado LIT (Liver Infusion Tryptose); y se deben mantener a una temperatura de 27, 5 °C logrando la división de los flagelos entre 18 a 20 horas, y en fase exponencial tiene una duración de 4 a 6 días. Estas condiciones depende de las cepas (Luis Reyes, 1991).

Para la forma infectiva amastigotes y tripomastigote, estos pueden ser mantenidas en cultivo celular entre 25 a 33 °C, se pueden usar células como fibroblastos, macrófagos, células epiteliales, renales, pulmonares, miocardios, etc. (Luis Reyes, 1991).

1.4.13 Utilización de modelo animal (*Mus músculos*) para *Trypanosoma cruzi*

Una de las alternativas en el laboratorio para mantener el parásito para estudios experimentales. Son modelos animales en ratones y son utilizados, ya que son muy susceptibles a la infección, pertenecen a una cepa pura o consanguíneas, fácil de reproducir y mantener en el laboratorio (Brener, 1965).

Siendo así, que estos individuos de una misma cepa llevan los mismos genes, por lo cual se facilita la comparación de los efectos de los diferentes tratamientos experimentales como los fármacos suministrados, entorno físico, etc., sin que se produzca confusión debido a las diferencias genéticas. La cepa más utilizada es BALB/c (ratón albino), aunque existen otras por ejemplo C57BL/6, que son usadas para ser manipuladas genéticamente en el estudio de las enfermedades humanas (Brener, 1965).

1.4.14 Histopatología de la enfermedad de Chagas

Diversos trabajos utilizando diferentes modelos experimentales mostraron que el *T. cruzi* presenta una gran variabilidad en sus propiedades biológicas, inclusive en el tropismo tisular (Brener, 1965; Chagas, 1909; Lenzi, Castelo-Branco, Pelajo-Machado, Oliveira, & Gattas, 1998; LS. & Brener, 1987). Así demostrando, que la variabilidad genética del parásito, los genotipos de *T. cruzi* filogenéticamente próximos o aparentados, tendrán propiedades biológicas o clínicas semejantes y los genotipos filogenéticamente distantes presentaran propiedades más distintas entre sí (Tibayrenc & Breniere, 1988) . Esta correlación entre divergencia filogenética y propiedades biológicas fue particularmente demostrada por (Toledo et al., 2002).

Por lo tanto esta distribución tisular preferencial de cepas de *T. cruzi* en humanos y animales se debe a que presentan tropismo para diferentes tipos celulares y, como consecuencia, la determinación del curso clínico de la enfermedad. Este escenario llevo a la creación del “Modelo Histotrópico Clonal” de la enfermedad de Chagas (Macedo & Pena, 1998) (Figura 6). Este modelo afirma que un grupo de cepa de *T. cruzi* pueden tener características genéticas similares y relacionarse entre sí. Sin embargo, estas relaciones pueden cambiar según el ambiente al que sean sometidos. Esta situación puede hacerse evidente en el paso del hospedero invertebrado al humano. Es así, que algunas cepas no pueden competir bajo las nuevas condiciones

del humano y no podrán sobrevivir. De esta manera, se vería reducida la complejidad de la cepa infectante (Macedo, Oliveira, & Pena, 2002).

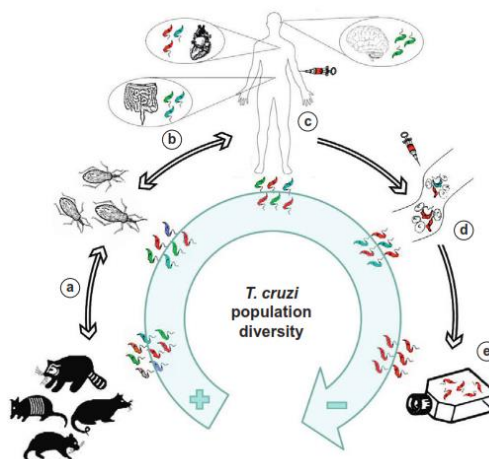


Figura 6:

Diagrama del modelo clonal Histotrópico de la enfermedad de Chagas.

Fuente: (Macedo & Pena, 1998)

(a) En el ciclo silvestre, muchos animales diferentes son conocidos por ser depósitos, y algunos triatomíneos son vectores. Por lo tanto, los mismos vectores pueden estar infectados simultáneamente por diferentes cepas de *T. cruzi*. (b) El paso de la población multiclonal a partir del vector de invertebrados a un ser humano se ve reducido por la complejidad de la cepa infectante en la fase aguda, y esta disminución es aún mayor en la fase crónica de la infección, debido a una mayor eliminación de clones, probablemente como resultado de factores inmunológicos (c) tropismo por diferentes tejidos (músculo cardíaco, plexos mientérico en el esófago y el recto, etc.), y por lo tanto un factor importante para determinar el curso clínico de la enfermedad. Selección clonal también puede ocurrir durante (d) el aislamiento del parásito y (e) el mantenimiento *in vitro*. Por lo tanto, los parásitos normalmente sometidos a la caracterización molecular podrían ser diferentes de los que están directamente presentes en los tejidos infectados y probablemente más asociados a las diferentes formas clínicas de la enfermedad.

Esta variación en el tropismo tisular de diferentes poblaciones de *T. cruzi* también fue demostrada por (Z. A. Andrade, 1999), que al infectar ratones BALB/c simultáneamente con dos diferentes poblaciones de parásito demostraron una clara diferencia en la distribución tisular de las poblaciones del parásito, tanto en las infecciones mixtas como en las infecciones monoclonales. Es así, que estos resultados no solamente ofrecen evidencia del tropismo tisular de cepas en fase crónica de la infección, si no también demostraron la importancia de considerar la variabilidad genética del hospedero en la distribución tisular del parásito.

2 CAPITULO II: MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Obtención de aislados de *Trypanosoma cruzi*

Las cepas ecuatorianas (*T. cruzi I*; *T. cruzi IV*; *T. cruzi V*) provenientes de insectos vectores y de pacientes, fueron proporcionadas por el Doctor Edwin Garzón, aisladas en diferentes zonas endémicas de la enfermedad en Ecuador en un estudio previo y conservadas en el Institut de Recherche pour le Développement (IRD) en Montpellier-Francia. Estos aislados llegaron al Ecuador como cultivo de epimastigotes en 1 ml del medio de cultivo LIT (Liver infusion triptose) (Anexo 1) y fueron transportados de acuerdo a todas las normas internacionales de bioseguridad, con los permisos requeridos por el Ministerio de Salud Pública del Ecuador.

2.1.1 Mantenimiento de epimastigote en medio de cultivo LIT

Los aislados ecuatorianos que formaron parte de este estudio fueron inoculados en medio de cultivo LIT. Los cultivos fueron revisados semanalmente y se escogió para este estudio una cepa de cada grupo filogenético presente en Ecuador (Garzón et al., 2002), como son: T.c. I: (Ecu 7); T.c. IV: (Ecu 6) y T.c. V: (Ecu 4).

2.1.2 Crecimiento de formas epimastigotes

El crecimiento de formas epimastigotes se realizó a partir de un cultivo de epimastigotes en fase exponencial, se procedió a sembrar 1×10^6 parásitos/ mL en frascos de cultivo celular conteniendo 10 ml de medio LIT por triplicado, estos fueron mantenidos a una temperatura de 28 °C. Los conteos del parásito se realizaron en una cámara de hemocitómetro (Kova Glasstiv Slide 10). La cinética de crecimiento de epimastigotes fue evaluada por dos parámetros (DTe) que significa el tiempo requerido del epimastigote para duplicarse en la fase logarítmica de crecimiento (en días).

2.2 Cultivo de líneas celulares LLcMK₂

En este estudio se utilizó una línea celular de riñón de mono macaco *Rhesus* (LLcMK₂); estas fueron cultivadas en medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) (Hyclone, Waltham, MA, USA) (Anexo 2), suplementado con suero fetal bovino (FBS) al 10% y antibióticos (100 U / ml de penicilina y 100 mg / ml de estreptomycin). Las células fueron conservadas en una incubadora de alta precisión (Memmert, Schwabach, Bavaria, Alemania) en condiciones estables de temperatura a 37 °C y 5% de CO₂ y en frasco de 75 ml (Corning, Invitrogen).

2.2.1 Obtención de tripomastigotes

Los primeros tripomastigotes fueron obtenidos a partir de un cultivo de epimastigotes en medio de cultivo LIT de tres semanas de crecimiento, se recolectó estos parásitos por centrifugación, a 3000 rpm por 10 minutos, luego este pellet fue resuspendido en suero activado, e incubado en condiciones estables a una temperatura de 37 °C, 5% de CO₂ y 12 horas. De esta manera se provocó la eliminación de epimastigote (formas sensibles al complemento) y se obtuvo formas tripomastigotes (resistentes al complemento), Estas formas tripomastigotes infectantes fueron utilizadas para infectar a las células de mamífero (LLcMK₂) para una producción en masa de estas formas parasitarias, Los tripomastigotes producidos en esta fase serán utilizados para realizar las infecciones experimentales en ratones BALB/c.

2.2.2 Producción de tripomastigotes a partir de infecciones celulares

Para la producción en masa de tripomastigotes, primeramente se empezó sembrando células de mamífero (LLcMK₂) en DEMEM suplementado con FBS 2% y antibióticos (100 U / ml de penicilina y 100 mg / ml de estreptomycin), con un número de 2×10^5 células/ml en frascos de 75 ml (Corning, Invitrogen), luego de dos días estas células fueron infectadas con las formas tripomastigotes, a una relación de 1:100 (célula: parásito). Y fueron recolectadas de 3 a 5 días según la cepa de parásitos inoculada

2.2.3 Crioconservación de parásitos

El medio de cultivo infectado de parásitos (forma tripomastigote) se centrifugo a 3000 rpm por 10 minutos en una centrifuga , luego este pellet fue re-suspendida en medio de cultivo suplementado con 10 % de dimetil sulfoxido (DMSO) estéril , se colocó cada muestra en crio viales de 2 ml , y se dejó cada tubo toda una noche a -80 °C, Después estos tubos debidamente etiquetados en fueron colocados en un tanque de nitrógeno Líquido modelo MVE XC 47/11-10 (Pracair, Danbury, CT, USA). Para su conservación definitiva.

2.2.4 Infección en células de mamífero (LLcMK₂)

Para este experimento las células de mamífero (LLcMK₂) fueron cultivadas en placas de cultivo de 24 pocillos (Corning), para el análisis de parásitos extracelulares e intracelulares, con 1 ml de DMEM suplementado con 10 % FBS y antibióticos (100 U / ml de penicilina y 100 mg / ml de estreptomycin), a una concentración de 5×10^4 células por pocillo. Las placas se incubaron por 48 horas hasta que las células alcanzaren el 80 % de confluencia. Después se infectaron estas células con $2,5 \times 10^5$ tripomastigotes de cada cepa. Se incubo la placa durante dos horas a 37 ° C en una incubadora con 5% de CO₂. Después de estas dos horas de infección se procedió a lavar cada pocillo tres veces con PBS 1 X (Anexo 3) estéril, para remover los parásitos extracelulares, y se cultivaron estas células en medio DMEM 2 % y antibióticos (100 U / ml de penicilina y 100 mg / ml de estreptomycin).

2.2.4.1 Determinación del porcentaje de infección en células de mamífero (LLcMK₂).

El porcentaje de células infectadas en los experimentos, se analizó en placas de 24 pocillos. Después de 24 o 48 horas p.i, se removió el sobrenadante y se lavó tres veces con 100 ul de PBS 1 X. Las células fueron fijadas con 100 ul de metanol absoluto y se incubo a temperatura ambiente por 10 minutos. Luego de este tiempo se removió el metanol y se dejó secar al aire libre. La tinción de estas células se realizó con colorante GIEMSA (Anexo 4), se agregó a cada pocillo 100 ul de este colorante a una porcentaje del 15 % y se incubo durante 20 minutos a temperatura ambiente. Un total

de 40 campos fueron examinados bajo luz microscópica en busca de formas amastigotes intracelulares., El porcentaje de infección se calculó con los valores medios por triplicado del número de células infectadas con amastigotes, a los dos puntos de infección (24 h y 48 h).

2.2.4.2 Egreso de tripomastigote en células de mamífero (LLcMK₂)

Para determinar el número de parásitos extracelulares se utilizaron placas de 24 pocillos y se realizó el conteo de egreso de tripomastigote por cada 3 días hasta los 25 días de post-infección, los parásitos fueron contados en un hemocitómetro (Kova Glasstiv Slide 10).

2.3 Análisis de curvas de parasitemia en ratones sensibles BALB/c

Se utilizaron ratones sensibles BALB/c hembras de 4-6 semanas de edad. Cuatro grupos de 4 ratones fueron infectados por vía intraperitoneal un total de 104 tripomastigotes/animal, ya sea con T.c. I T.c. IV y T.c. V en un volumen final de 0.2 ml de PBS estéril. Las parasitemia fueron analizadas en 10 µl de sangre tomada a partir de la parte terminal de cola de animales infectados. Se realizó el conteo de parásitos bajo microscopia de luz blanca en magnitud de 40 X. El número total de parásitos se calculó de acuerdo en sangre a (Brener, 1965). En donde el límite de detección fue 3.5×10^4 parásitos /ml (Formula 1.). Los conteos de parasitemia se realizaron a 7, 14, 21, 28, 35 días post-infección.

Formula 1.- Número total de parásitos

$$\text{Número total de tripomastigote/ml} = \# \text{ de parasitos} * 3,5 * 10^4 / \text{ml}$$

2.4 Análisis histopatológico en ratones sensibles BALB/c

Se colectaron el corazón y los cuádriceps a 90 días de post-infección (fase crónica) de ratones infectados con cada cepa (T.c. I, T.c. IV y T.c. V). Ratones control fueron inoculados con PBS estéril. Los órganos colectados se fijaron con formaldehído al 4% para finalmente incluirlos en parafina. Cortes de 5 µm de espesor fueron teñidos con hematoxilina-eosina. La severidad de la inflamación o la presencia de pseudoquistes fue descrito según la siguiente escala: + indicaría menos del 25% del área afectada; ++ 25-50% del área afectada y +++ más del 50%.

2.5 Análisis estadístico

Se empleó para todos los experimentos un diseño ANOVA cruzada anidado para medias no repetitivas (Anexo: 8, 10, 13, 15): utilizando parámetros: cepa/grupo filogenético, Se realizó la prueba de significancia estadística de Tukey (Anexo: 9, 11, 14, 16) con un nivel de significancia de $<0,05$ (*). Para observar el comportamiento de las cepas según sus diferencias. El análisis fue desarrollado en el programa Graph Pad computer program (Graph Pad 6, San Diego, CA).

3 CAPITULO III: Resultados

3.1 Curvas de crecimiento de epimastigote en medio de cultivo LIT

El crecimiento de formas epimastigotes se realizó a partir de un cultivo de epimastigotes en fase exponencial de cada uno de las cepas analizadas (T.c. I T.c. IV y T.c. V), se sembraron 1×10^6 parásitos/mL. Se observa que la cepa T.c. I: (Ecu 7) tiene un pico de crecimiento a los 21 días mucho más alto y significativo con un total de epimastigotes de $1,4 \times 10^8$ parásitos/ml comparado a las dos otras cepas T.c. IV y T.c. V. El pico de crecimiento de la cepa T.c. IV fue 5 días antes con un número total de $0,9 \times 10^8$ parásitos/ml. De manera interesante se observó que la curva de crecimiento de la cepa T.c. V, fue sumamente baja con un número de parásitos que oscilan $0,05 \times 10^8$ parásitos/ml. La cinética de epimastigotes de cada cepa evaluada se ilustra en la Figura 7. En resumen los resultados mostraron que T.c. V tiene una tasa de crecimiento muy bajo y significativo comparado con T.c. I y T.c. IV (Anexo 8,9).

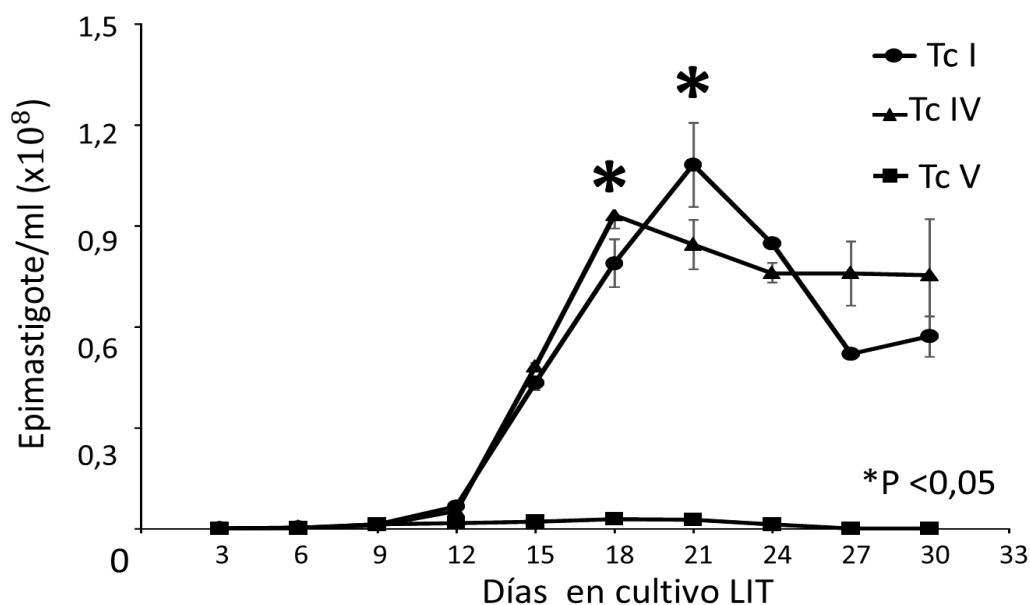


Figura 7:

In-vitro curvas de crecimiento de epimastigotes del grupo T.c. I (círculo), T.c. IV (triángulo) y T.c. V (cuadrado), en medio de cultivo axénico LIT. Los datos son desviación estándar (\pm S.D.) de 4 repeticiones por cada grupo estudiado. Asteriscos indican el punto del tiempo que muestra diferencias significativas entre grupos (*P < 0,05).

3.2 Infección en células de mamífero (LLcMK₂)

3.2.1 Porcentaje de infección en células de mamífero (LLcMK₂)

La capacidad de infección intracelular en células de mamífero (LLcMK₂) mostraron diferencias entre los grupos filogenéticos (Figura 8.). Siendo así que el porcentaje de células infectadas a 24 h y 48 h fueron analizadas. Y se observó que a 24 h p.i. el porcentaje de células infectadas fue mucho mayor con la cepa T.c. I = 7%, comparado con células infectadas con T.c. IV = 0% y T.c. V = 0%. En donde no se encontró ninguna célula infectada para estos dos grupos genéticos del parásito. A 48 h p.i. se observó que las células infectadas con T.c. I dobló el porcentaje de células infectadas (14%). Por otro lado se observó que el porcentaje de células infectadas con la cepa T.c. IV fue del 7% a 48 h p.i. De manera interesante no se observó ninguna célula infectada en el grupo genético T.c. V (0%) a 48 h p.i. (Anexo 12, 13, 14).

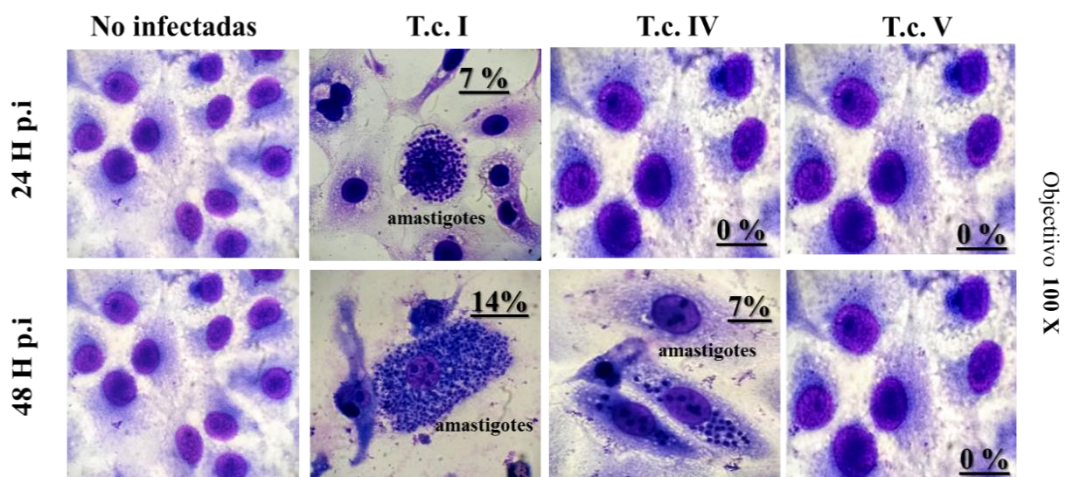


Figura 8:

In-vitro parásitos intracelulares amastigotes, porcentaje de infección en células mamíferas (LLcMK₂). (Tinción GIEMSA (15%)).

3.2.2 Egreso de tripomastigote en células de mamífero (LLcMK₂)

Se pudo observar en el caso de la cepa T.c. I presenta un ritmo de multiplicación más rápida con una pronta liberación de tripomastigotes al día 7 p.i y un número mucho mayor de tripomastigotes extracelulares al día 10 p.i con un pico de 1×10^6 parásitos/ml, comparado con las dos otras cepas estudiadas. En la cepa T.c. IV se pudo observar pequeñas cantidades de formas tripomastigotes libres a los 10 días p.i. a $0,02 \times 10^6$ parásitos/ml, alcanzando su pico de egreso al día 25 p.i. ($0,6 \times 10^6$ parásitos/ml). De manera interesante se observó los primeros tripomastigotes de la cepa T.c. V a los 25 días de p.i. con un pico de parásitos relativamente baja a $0,1 \times 10^6$ parásitos/ml, Comparado para los picos de egreso de las cepas T.c. I y T.c. IV. Los parásitos extracelulares de cada cepa evaluada se ilustran en la Figura 9. En resumen lo resultados mostraron que T.c. I presenta un egreso prematura y un número mayor de tripomastigote extracelulares mostrando una significancia alta, comparado con los otros grupos filogenéticos, (Anexo 10,11).

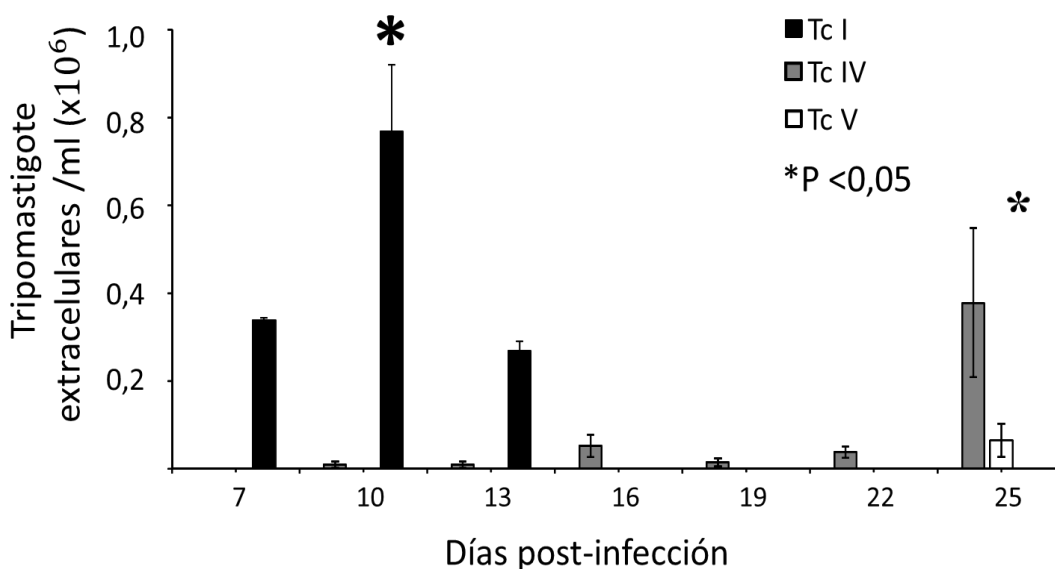


Figura 9:

In-vitro egreso de tripomastigotes en células infectadas LLcMK₂ de T.c. I (Cuadrado Negro), T.c. IV (Cuadrado plomo) y T.c. V (Cuadrado Blanco). Los datos son desviación estándar (\pm S.D.) de 4 repeticiones por grupo. Asteriscos indican el punto del tiempo que muestra diferencias significativas entre grupos de células infectadas (*P < 0,05).

3.3 Curvas de parasitemia en ratones sensibles BALB/c

Se realizó el conteo de parásitos bajo microscopía de luz blanca. Las formas tripomastigotes circulantes en la sangre fueron determinadas a 7, 14, 21, 28, 35, 42, 49 y 180 días p.i. Se pudo observar en los ratones infectados con la cepa T. c. I el pico de parasitemia fue a los 28 días (1.8×10^6 parásitos/ratón) tan rápido aumento en los recuentos de parásitos y una parasitemia máxima a los 35 días p.i, y se pudo observar en esta cepa parásitos hasta el 49 p.i. Por otro lado los ratones infectados con la cepa T.c. V, desarrollaron parasitemias bastante bajas, casi imperceptibles, con un pico de parasitemia no evidente y se pudieron observar parásitos hasta el día a 42 días p.i. De manera interesante en el grupo de ratones infectados con la cepa T.c. IV no se pudo detectar la presencia de parásitos en sangre durante toda la etapa de p.i, que duró 49 días.

Las parasitemias de cada cepa evaluada se ilustran en la Figura 10. En resumen lo resultados mostraron que T.c. I tiene una carga parasitaria bastante significativo, comparado con los otros grupos filogenéticos (Anexo 15,16).

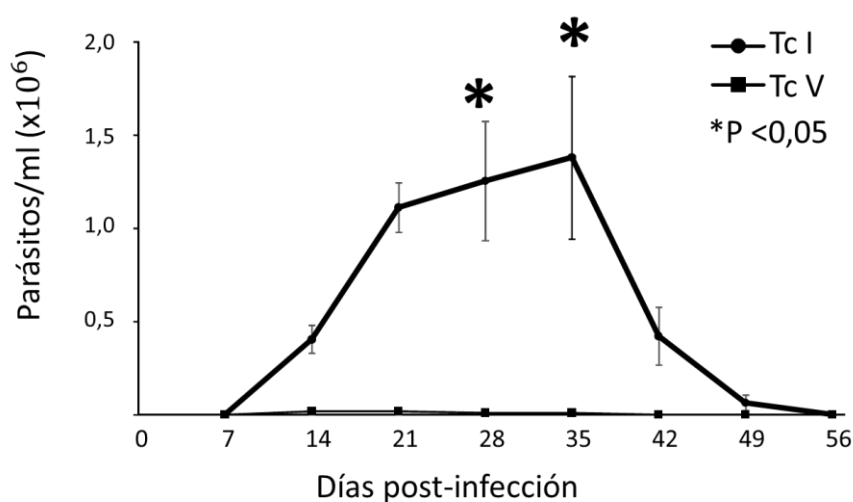


Figura 10:

In-vivo parasitemia en sangre de ratones Balb/c infectados con 10^4 Tripomastigotes de T.c. I y T.c. V durante la fase aguda (7, 14, 21, 28, 35, 42 y 49 días p.i). Los datos son desviación estándar (\pm S.D.) de 4 ratones por grupo de infección. Asteriscos indican punto de tiempo que muestra diferencias significativas entre grupos de ratones infectados (* $P < 0,05$).

3.4 Porcentaje inflamatorio en músculo cardíaco y esquelético en fase la crónica de la enfermedad

El corazón y los cuádriceps fueron examinados a los 90 días p.i. (fase crónica) Los resultados muestran que el grupo de ratones infectado con la cepa T.c. V, presentan una mayor severidad de procesos inflamatorios con múltiples infiltraciones celulares difusas, con una área afectada de mayor del 50% (+++) sin presencia de nidos amastigotes (pseudoquistes) (Figura 11. D). En cambio los ratones infectados con la cepa T.c. I presentaron menos del 25% de área afectada, con procesos inflamatorios focalizados y presencia de nidos amastigotes (Figura 11. B, 11.E). Por ultimo en el caso de los ratones infectados con la cepa T.c. IV no se encontró ningún proceso inflamatorio ni presencia de nidos amastigotes (Figura 11.C). De manera interesante no se pudo observar en ninguno la presencia de procesos inflamatorios y nidos amastigotes en el tejido cardíaco.

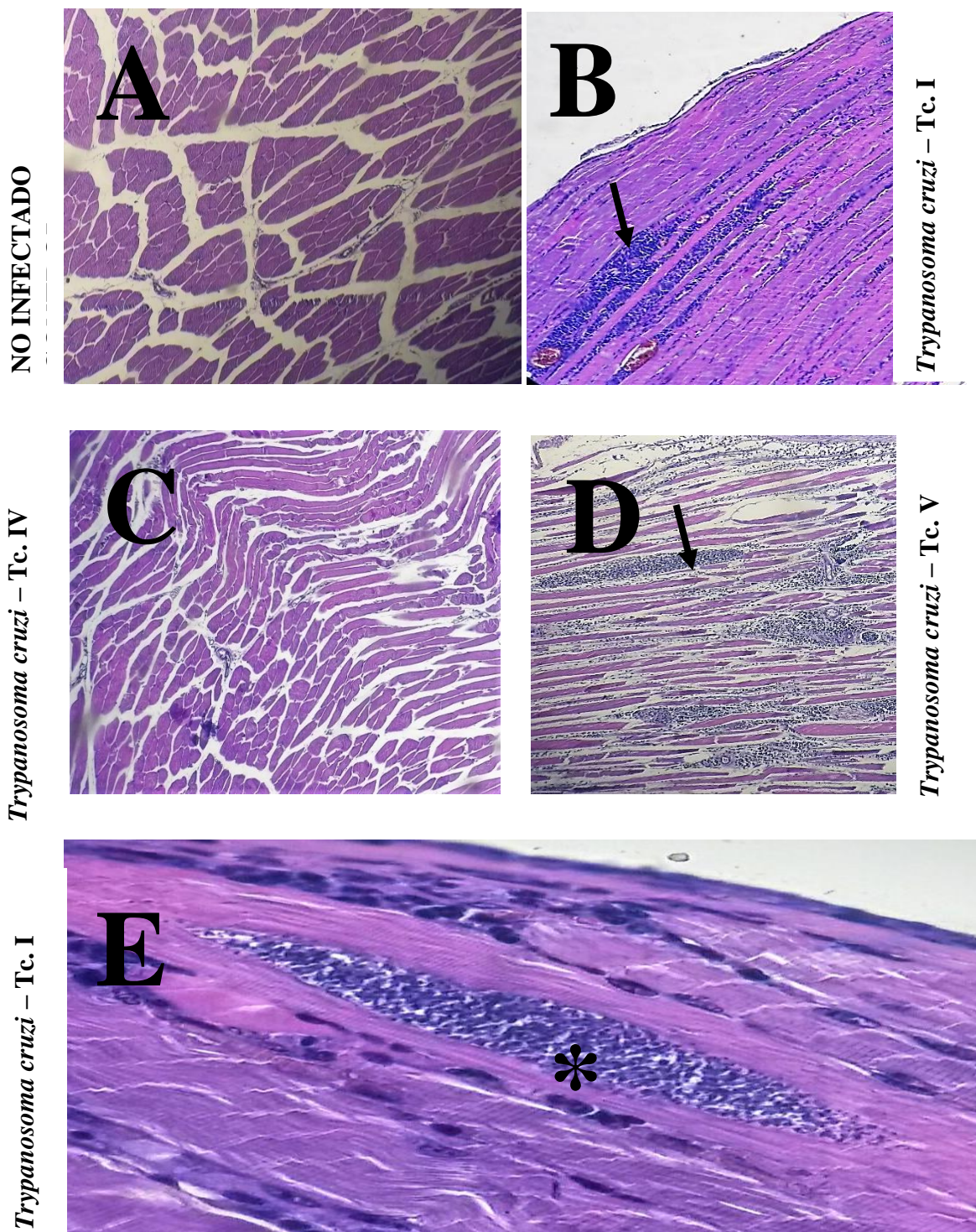


Figura 11:

Análisis histopatológico de los músculos esqueléticos en inflamaciones (B, C, D) y nidos de amastigotes (E) en 90 días pi. Y controles no infectados (A), se examinaron por microscopía de luz y se fotografió con un objetivo 40 X. Áreas que presentan daño celular mayor o edema se indican mediante una flecha y nidos amastigotes con un asterisco. (Cortes de 5 um de espesor, teñidos con hematoxilina-eosina).

4 CAPITULO IV: DISCUSIÓN

Varios son los estudios que se han realizado para ver la posible relación que existe entre la variabilidad genética de *T. cruzi* y los diferentes grados de virulencia tanto *in vitro* como *in vivo* (S. G. Andrade, 1985; V. Andrade, Brodskyn, & Andrade, 1983; Laurent, Barnabe, Quesney, Noel, & Tibayrenc, 1997; Toledo et al., 2002) . Todos esto estudios han permitido demostrar que existe una fuerte asociación entre la distancia genética y las propiedades biológicas del parásito. En el caso de Ecuador no existen trabajos previos de la virulencia de estas cepas. Esta tesis sería la primera investigación que se centra en estudiar las propiedades biológicas de los diferentes grupos genéticos, que circulan en las zonas endémicas de la enfermedad de Chagas en el país. Para este estudio se utilizó cepas aisladas y caracterizadas previamente por (Garzón et al., 2002). Para este propósito se realizó un estudio exhaustivo de la capacidad de infectividad y patogenicidad de cepas ecuatorianas de *T. cruzi* genéticamente distintas (T.c. I, T.c. IV y T.c. V), tanto *in vitro*: en células de mamífero (LL_CMK₂), como *in vivo*: en ratones sensibles Balb/c.

4.1 Curvas de crecimiento de epimastigotes en medio de cultivo LIT

Los experimentos realizados sobre el crecimiento de las formas epimastigotes en medio LIT mostraron que las cepas T.c. I y T.c. IV tienen niveles de crecimiento bastante grandes en comparación a la cepa T.c. V. Este trabajo concuerda en cierta manera con estudios anteriores realizados por (Laurent et al., 1997), en donde se demostró valores más altos para el crecimiento de epimastigotes para el grupo T.c. I en relación con T.c. V, que presento valores intermedios. En nuestro trabajo, esta diferencia es incomprensible, en donde las curvas de crecimiento de epimastigotes del grupo T.c. V son sumamente bajas en relación a los grupos T.c. I y T.c. IV que tienen un crecimiento relativamente similar. Se podría pensar que esta diferencia abismal del bajo crecimiento de epimastigotes del grupo T.c. V es debido a que no estuvo sumamente sincronizada el inoculó de partida, sabiendo que en las tres cepas estudiadas los epimastigotes presentaban una supervivencia del 98%. Por otro lado, según (Bosseno, Yacsik, Vargas, & Breniere, 2000), demostraron con otros grupos de *T. cruzi*, que la tasa de crecimiento en medio de cultivo axénico difiere con el insecto vector triatomino. Además (García, Castro, Figueiredo, & Azambuja, 2012), sugiere que

um excelente modelo para este estudio, sea una interacción parásito-vector, así analizando el desarrollo del parásito en el intestino, hemolinfa y glándulas salivales.

4.2 Infección en células de mamífero (LL_CMK₂)

Dentro de la literatura existen dos líneas celulares más comúnmente utilizados para realizar infecciones con *T. cruzi* son células Vero y LL_CMK₂. Estas células se han utilizado para estudiar los factores que influyen en la infectividad como son: la internalización de la célula huésped y la reproducción intracelular (Dvorak & Poore, 1974).

4.2.1 Porcentaje de infección en células de mamífero (LL_CMK₂)

Nuestro estudio demostró que existen diferencias en cuanto al porcentaje de infección con los diferentes tripomastigotes pertenecientes a grupos genéticamente distintos. Demostrando, que el grupo T.c. I tiene la capacidad de infección más rápida con un mayor número de células infectadas, con una infección a 24 h de p.i. del 7 % y a 48 h p.i. del 14 %. Por otro lado, el grupo T.c. V no se encontró ninguna célula infectada a 24 h y 48 h p.i. este resultado coincide en cierta manera con estudios anteriores realizados por (Revollo et al., 1998), en donde demostraron que en células Vero (5 % FBS) a 30 horas de p.i., las cepas del grupo T.c. I presentaba un porcentaje de infección del 17,98 %. Por otro lado en este estudio observo que las cepas de T.c. V presentaban un porcentaje de infección al 13,67 % p.i. Por consiguiente, estos resultados se podría ser al tipo de línea celular y a la concentración de suero, ya que según (Piras, Henriquez, & Piras, 1987) , afirma que la fijación y la infectividad de las líneas celulares se ve reforzada por la presencia de suero, donde demostró que la infectividad en cultivo de células Vero, hubo un aumento de fijación y penetración a las células huésped, al incrementar FBS del 0,4% al 1,0%. En nuestro estudio todas las infecciones se realizaron al 2% FBS. Por otra parte, según (Dvorak & Hyde, 1973) manifiesta que en el ciclo intracelular del *T. cruzi*, los amastigotes permanecen en reposo durante 24 o 35 h p.i. Para luego, comenzar su crecimiento por fisión binaria en un máximo de nueve ciclos, además algunos autores creen que un factor limitante para la multiplicación del parásito es el área citoplasmática de la célula huésped. Siendo así, que en este estudio se presenta diferentes porcentajes de infección.

4.2.2 Egreso de tripomastigote en células de mamífero (LLcMK₂)

El tiempo de liberación de los tripomastigotes, varía dependiendo de la cepa, así como también de la línea celular (Mortara et al., 1999). Es así, como en el presente trabajo, el tiempo de liberación de los tripomastigotes, se observaron que el grupo T.c. I produjo un número mayor de tripomastigotes extracelulares a los 10 días de p.i. y T.c. V a los 25 días de p.i, estos datos de manera semejante coincide con lo reportado por (Andrews, Hong, Robbins, & Nussenzweig, 1987) en donde utilizó células LLcMK₂ y obtuvo una salida de parásitos extracelulares a los trece días de p.i. Esto podría deberse a la dependencia de la interacción entre célula y parásito, ya que según (Calderon-Arguedas Olger, 2002; Mortara, da Silva, Araguth, Blanco, & Yoshida, 1992), argumenta que la “capacidad de infección depende de cada cepa de *T. cruzi* y también, a las moléculas que están presentes en la superficie de la célula huésped y el parásito”. Por tanto, no se puede excluir que las moléculas secretadas por el parásito, pueden desempeñar algún papel en este proceso (de Souza et al., 2010). Siendo así, uno de ellos son: las glicoproteínas o la actividad transialidasas, que provocan que exista una mayor capacidad de infección por ejemplo las glicoproteínas 82 o glicoproteínas 35, entre otras (Atayde et al., 2004; Monteiro et al., 2013).

Por otro lado son pocos los estudios que existen sobre caracterizaciones biológicas del grupo T.c. IV. Esto se debe a que este grupo es divergente en América del Sur y Norte. Además estas cepas, generalmente está asociado con huéspedes y vectores selváticos. Sin embargo, aunque este grupo puede causar infección en humanos, estas han sido de manera esporádica en el ciclo doméstico (Herrera et al., 2007), pero en nuestro estudio demostramos que este grupo T.c. IV solo presenta 7 % de infección a 48 h de p.i. y un egreso parasitario a los 25 días de p.i. De manera general, este estudio aporta a la comprensión del comportamiento biológico de esta cepa poco estudiada.

4.3 Curvas de Parasitemia en ratones sensibles BALB/c

Las parasitemias en ratones infectados con las tres cepas genéticamente distintas (T.c. I, T.c. IV y T.c. V), mostraron grandes diferencias entre ellas. Siendo así que el grupo T.c. I produce más altos niveles de parasitemias con un pico máximo a los 28 días p.i. Caso contrario se observó en el grupo T.c. V en donde las parasitemias fueron sumamente bajas y sin pico definido. De manera sorprendente en este estudio no se pudo determinar las parasitemias en ratones infectados con el grupo T.c. IV, los parásitos en este grupo fueron indetectables en sangre periférica. Este trabajo concuerda con la mayor parte de estudio hechos por (Roellig & Yabsley, 2010), en donde demuestra la presencia de altas parasitemias provocadas en ratones infectados con este grupo T.c. I, pero difieren en su totalidad comparado con el grupo T.c. IV. Se podría pensar que este curso de la parasitemia se ve influida por la edad de acogida del huésped, el anfitrión de origen de la especie, el tamaño, sitio de inóculo y la virulencia de la cepa en estudio (Tibayrenc & Breniere, 1988). Por otra parte, podría deberse a que ciertas cepas de *T. cruzi* producen proteínas específicas de la familia de las transalidasas, provocando la desviación de la respuesta inmune o bloqueando la respuesta de la célula T (Martin & Tarleton, 2004), o también la producción de proteínas ribosomales que presentan un mecanismo de defensa antioxidante como adaptación previa al estallido de la célula fagocítica del hospedero (Atwood et al., 2005). Además, otra explicación de la presencia de tripomastigotes en sangre, se ha demostrado que la forma delgada desaparece rápidamente (1 o 2 horas) localizándose dentro de la célula o son destruidos, mientras que las formas grandes permanecen en la circulación sanguínea (durante 1 semana) (Brenner et al., 1969). Que explicarían las diferencias en la aparición de la parasitemia en sangre circulante de los ratones. Por otro lado, este trabajo está completamente desacuerdo con los trabajos realizados por (Monteiro et al., 2013). En donde demuestran resultados sumamente mayores parasitemias con el grupo T.c. IV comparado con el grupo T.c. I.

4.4 Porcentaje inflamatorio en músculo cardíaco y esquelético en fase la crónica de la enfermedad

Trabajos previos en ratones BALB/c se han demostrado que luego de tres meses de infección, con diferentes cepas de *T. cruzi* pueden presentar procesos inflamatorios cardíacos, esofágicos y esqueléticos, siendo el periodo correspondiente a la fase crónica de la enfermedad en dicho modelo experimentales (L. O. Andrade, Machado, Chiari, Pena, & Macedo, 2002). Por otro lado, ciertos grupos de *T. cruzi* pueden presentar una mayor tendencia a ubicarse preferentemente en algunas localizaciones tisulares (Wallace et al., 2001), esta determinación del tropismo puede o no tener relación con las características de la enfermedad en las zonas geográficas de donde proviene (Oliveira et al., 1993; Watkins, 1966).

Es importante destacar que diversos estudios han reportado que, el músculo esquelético como uno de los órganos que más se encuentra parasitado con *T. cruzi* en la fase crónica de la enfermedad (Cummings & Tarleton, 2003) . Lo encontrado en este estudio corrobora lo anterior, donde se demostró que el grupo de ratones infectado con la cepa T.c. V, presentan una mayor severidad de procesos inflamatorios con múltiples infiltraciones celulares difusas, con una área afectada de mayor del 50% sin presencia de nidos amastigotes (seudoquistes) en el músculo esquelético. Estas lesiones difusas pueden estar relacionado a las reacciones autoinmune del organismo, siendo así que estos grupos de parásitos se multiplican dentro de las células provocando su rotura y liberando mediadores de la inflamación de varios tipos (Z. A. Andrade, 1999).

En cambio los ratones infectados con la cepa T.c. I presentaron menos del 25% de área afectada, con procesos inflamatorios focalizados y presencia de nidos amastigotes, siendo así que las lesiones focales están asociadas a la presencia del parásito provocando ruptura de células parasitadas (Z. A. Andrade, 1999). Nuestros resultados concuerdan con lo planteado por (Anez et al., 2004), quienes encontraron que la infección con T.c. I presenta parasitemias mucho más altas y que, además, genera en pacientes durante la fase crónica un alto grado de daño músculo esquelético (Camandaroba, Campos, Magalhaes, & Andrade, 2001), pero no coincide con los procesos inflamatorios en músculo cardíaco.

Otro estudio realizado por (Roellig & Yabsley, 2010) demuestra que el grupo T.c. I presenta nidos de amastigotes y lesiones inflamatorias leves y presencia de proceso inflamatorio en el músculo esquelético, corazón y cerebro, mientras que T.c. IV promovió proceso inflamatorio leve únicamente en el músculo esquelético. Este resultado de cierta manera concuerda con el grupo T.c. I pero no en relación con el grupo T.c. IV. Ya que nuestros resultados con ratones infectados con este grupo, no se encontró ningún proceso inflamatorio ni presencia de nidos amastigotes. Se podría suponer que estas cepas pueden ser eliminadas por su inhabilidad para competir y propagarse en el hospedero, o por la acción de sus mecanismos de defensa (Macedo & Pena, 1998).

La presencia de nidos de amastigotas y de los demás daños histopatológicos a nivel de músculo esquelético en el grupo de cepas de T.c. I, muestra una relación directa con el nivel de parasitemia alcanzado, lo que indica que los parásitos después de instalarse y reconocer los diferentes tejidos se reproducen intensamente a nivel intracelular, dando lugar a cada vez mayor número de parásitos en sangre luego de diferenciarse en tripomastigotas (Devera, Fernandes, & Coura, 2003). Esta secuencia no se observa en el grupo de T.c. V, ya que desarrollan parasitemias bastante bajas, casi imperceptibles, ocasionando una mayor severidad de procesos inflamatorios.

De manera interesante no se pudo observar en ninguno la presencia de procesos inflamatorios y nidos amastigotes en el tejido cardíaco. Esta idea nos permite sugerir que la variabilidad genética de los parásitos es uno de los factores determinantes de la distribución diferencial en los tejidos y, probablemente, de las manifestaciones clínicas de la enfermedad de Chagas.

5 CAPITULO V: CONCLUSIONES

Se ha demostrado que las tres cepas de *T. cruzi* endémicas del Ecuador presenta diferentes características biológica e histopatológicas.

Siendo así, que dentro de las características biológicas de las tres cepas de *T. cruzi* se comparó la tasa de crecimiento cinético del epimastigotes en medio de cultivo LIT, y se demostró que el grupo T. c. V tiene una tasa de crecimiento muy baja pero significativa comparado con los grupos T.c. I y T.c. IV.

Por otro lado, los resultados *in-vitro* e *in-vivo* han demostrado que estas tres cepas de *T. cruzi* endémicas del Ecuador presentan diferencias en la virulencia, tanto en su capacidad para invadir las células, como probablemente la evasión de la respuesta inmune del huésped o la expresión de las proteínas superficiales de la membrana del parásitos, que serían los responsables de la carga parasitaria y el tropismo tisular, así esta virulencia parece ser una propiedad intrínseca de cada cepa. Demostrando así, las siguientes conclusiones:

- Se diferenció el poder infeccioso de los parásitos genéticamente distintos a infectar en células de mamífero (LLcMK₂), y se demostró que el grupo T.c. V no infecto a 24 h o 48 h p.i. caso contrario el grupo T.c. I tuvo mayor porcentaje de infección.
- Se estudió la capacidad de infección de los parásitos genéticamente distintos en ratones sensibles BALB/c. y se observó que el grupo T.c. I presento un pico de parasitemia mayor y significativo comparado con el grupo del T.c. V. De manera interesante en el grupo de ratones infectados con la cepa T.c. IV no se pudo detectar la presencia de parásitos en sangre.

- Se evaluó el porcentaje inflamatorio en músculos cardíacos y esqueléticos en fase crónica de la enfermedad. Demostrando que el grupo T.c. V presenta mayor severidad de procesos inflamatorios y no presencia de nidos amastigotes (seudoquistes), en cambio el grupo T.c. IV no se encontró ningún proceso inflamatorio ni presencia de nidos amastigote. De manera interesante ningún grupo presento inflamación en músculo cardíaco.

Dicho lo anterior, se ha demostrado que las diferencias observadas *in vitro* en el grupo genético del T.c. V no refleja la patogenicidad *in vivo*. Siendo así, que este grupo presenta baja parasitemia (*in vitro*) pero alta patogenicidad (*in vivo*). Caso contrario el grupo T.c. I presenta alta parasitemia pero mediana patogenicidad.

Por otro lado, son pocos los estudios que existen sobre caracterizaciones biológicas del grupo T.c. IV. Por lo tanto, esta tesis ha demostrado primeras investigaciones sobre este grupo.

Finalmente, este tipo de estudio puede ayudar a comprender los factores que influyen en los cuadros epidemiológicos particulares de transmisión de la enfermedad de Chagas en las diferentes regiones endémicas del Ecuador.

6 CAPITULO VI: RECOMENDACIONES

Para futuras investigaciones se recomienda utilizar un número mayor de cepas pertenecientes a estos tres grupos genéticos, así permitirá determinar si la evolución de la enfermedad de Chagas, depende de la variabilidad genética del parásito tanto en la virulencia como la patogenicidad.

Es necesario experimentar la tasa de crecimiento cinético de epimastigote, en modelo parásito-vector, así analizando la interacción y el desarrollo del parásito en el intestino, hemolinfa y glándulas salivales.

Se recomienda realizar más estudios *in-vitro* sobre todo en la interacción de *T. cruzi* en célula huésped, como son: la utilización de otras líneas celulares, la concentración de suero fetal bovino y además de evaluar expresiones de proteínas de superficies. Con el fin de mejorar la comprensión de la virulencia de la enfermedad, tanto en la infección como lisis celular causada por el parásito.

Es aconsejable realizar más estudios *in-vivo* sobre todo en ratones BALB/c, como son: las diferentes vías de inoculación del parásito (vía intradérmica, subcutánea), además de la utilización en ratones machos, ya que son más susceptibles a la infección por *T. cruzi*. Por otra parte, es necesario que se evalúe el tropismo tisular en la mayoría de órganos, con el fin de determinar los daños patogénicos provocados por el parásito.

Finalmente es necesario determinar sí la evolución de la enfermedad depende de la alteración de la respuesta inmunitaria del huésped mamífero, después de una infección con los diferentes grupos genéticos del parásito. Así realizando estudios con técnicas moleculares e inmunológicas tanto en la fase aguda y crónica.

7 CAPITULO VII: BIBLIOGRAFÍA

- Abad-Franch, F. (2003). The ecology and genetics of Chagas disease vectors in Ecuador, with emphasis on *Rhodnius ecuadoriensis* (Hemiptera : Reduviidae : Triatominae).
- Aguilar, M., Abad-Franch, F., Racines, J., & Paucar, T. (1999). Epidemiology of Chagas Disease in Ecuador. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 94, 387-393.
- Andrade, L. O., Machado, C. R., Chiari, E., Pena, S. D., & Macedo, A. M. (2002). *Trypanosoma cruzi*: role of host genetic background in the differential tissue distribution of parasite clonal populations. *Exp Parasitol*, 100(4), 269-275.
- Andrade, S. G. (1985). Morphological and behavioral characterization on *Trypanosoma cruzi* strains. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 18, 39-46.
- Andrade, V., Brodskyn, C., & Andrade, S. (1983). Correlation between isoenzyme patterns and biological behavior of different strains of *Trypanosoma cruzi*. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 77(6), 796-799.
- Andrade, Z. A. (1999). Immunopathology of Chagas Disease. *Memoria de instituto de Oswaldo Cruz*, 71-80.
- Andrews, N. W., Hong, K. S., Robbins, E. S., & Nussenzweig, V. (1987). Stage-specific surface antigens expressed during the morphogenesis of vertebrate forms of *Trypanosoma cruzi*. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Exp Parasitol*, 64(3), 474-484.

- Andrews, N. W., & Whitlow, M. B. (1989). Secretion by *Trypanosoma cruzi* of a hemolysin active at low pH. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Mol Biochem Parasitol*, 33(3), 249-256.
- Anez, N., Crisante, G., da Silva, F. M., Rojas, A., Carrasco, H., Umezawa, E. S., . . . Teixeira, M. M. (2004). Predominance of lineage I among *Trypanosoma cruzi* isolates from Venezuelan patients with different clinical profiles of acute Chagas' disease. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Trop Med Int Health*, 9(12), 1319-1326. doi: 10.1111/j.1365-3156.2004.01333.x
- Atayde, V. D., Neira, I., Cortez, M., Ferreira, D., Freymuller, E., & Yoshida, N. (2004). Molecular basis of non-virulence of *Trypanosoma cruzi* clone CL-14. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Int J Parasitol*, 34(7), 851-860. doi: 10.1016/j.ijpara.2004.03.003
- Atwood, J. A., 3rd, Weatherly, D. B., Minning, T. A., Bundy, B., Cavola, C., Opperdoes, F. R., . . . Tarleton, R. L. (2005). The *Trypanosoma cruzi* proteome. [Research Support, N.I.H., Extramural Research Support, U.S. Gov't, P.H.S.]. *Science*, 309(5733), 473-476. doi: 10.1126/science.1110289
- Ben Younes-Chennoufi, A., Hontebeyrie-Joskowicz, M., Tricottet, V., Eisen, H., Reynes, M., & Said, G. (1988). Persistence of *Trypanosoma cruzi* antigens in the inflammatory lesions of chronically infected mice. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 82(1), 77-83.
- Bosseno, M. F., Yacsik, N., Vargas, F., & Breniere, S. F. (2000). Selection of *Trypanosoma cruzi* clonal genotypes (clonet 20 and 39) isolated from Bolivian triatomines following subculture in liquid medium. [Comparative Study Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 95(5), 601-607.
- Brener, Z. (1965). (Comparative Studies of Different Strains of *Trypanosoma Cruzi*.). *Ann Trop Med Parasitol*, 59, 19-26.

- Brener, Z. (1973). Biology of *Trypanosoma cruzi*. [Review]. *Annu Rev Microbiol*, 27, 347-382. doi: 10.1146/annurev.mi.27.100173.002023
- Brener, Z., Tafuri, W. L., & Maria, T. A. (1969). An electron microscope study of *Trypanosoma cruzi* intracellular forms in mice treated with an active nitrofurantoin compound. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*, 11(4), 245-249.
- Burleigh, B. A., & Andrews, N. W. (1995). The mechanisms of *Trypanosoma cruzi* invasion of mammalian cells. [Research Support, Non-U.S. Gov't Research Support, U.S. Gov't, P.H.S.]. *Annu Rev Microbiol*, 49, 175-200. doi: 10.1146/annurev.mi.49.100195.001135
- Calderon-Arguedas Olger, A. T., Alfredo Castro, Olga Guerrero y Misael Chinchilla. (2002). Infestación por vectores de la Enfermedad de Chagas en cuatro zonas endémicas de la meseta central de Costa Rica. *Parasitol Latinoam*, 57, 88 - 95.
- Camandaroba, E. L., Campos, R. F., Magalhaes, J. B., & Andrade, S. G. (2001). Clonal structure of *Trypanosoma cruzi* Colombian strain (biodeme Type III): biological, isoenzymic and histopathological analysis of seven isolated clones. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Rev Soc Bras Med Trop*, 34(2), 151-157.
- Carvalho, T. M., Ferreira, A. G., Coimbra, E. S., Rosestolato, C. T., & De Souza, W. (1999). Distribution of cytoskeletal structures and organelles of the host cell during evolution of the intracellular parasitism by *Trypanosoma cruzi*. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *J Submicrosc Cytol Pathol*, 31(3), 325-333.
- Cummings, K. L., & Tarleton, R. L. (2003). Rapid quantitation of *Trypanosoma cruzi* in host tissue by real-time PCR. [Evaluation Studies Research Support, Non-U.S. Gov't Research Support, U.S. Gov't, P.H.S.]. *Mol Biochem Parasitol*, 129(1), 53-59.

- Chagas, C. (1909). Nova tripanossomíase humana. Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp., agente etiológico de nova entidade mórbida do homem. *Mem.Inst.Oswaldo Cruz*, 159-218.
- de Araujo-Jorge, T. C. (1989). The biology of *Trypanosoma cruzi*-macrophage interaction. [Review]. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 84(4), 441-462.
- De Araujo-Jorge, T. C., Barbosa, H. S., & Meirelles, M. N. (1992). *Trypanosoma cruzi* recognition by macrophages and muscle cells: perspectives after a 15-year study. [Review]. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 87 Suppl 5, 43-56.
- De Souza, W. (2002). Basic cell biology of *Trypanosoma cruzi*. [Research Support, Non-U.S. Gov't Review]. *Curr Pharm Des*, 8(4), 269-285.
- de Souza, W., de Carvalho, T. M., & Barrias, E. S. (2010). Review on *Trypanosoma cruzi*: Host Cell Interaction. *Int J Cell Biol*, 2010. doi: 10.1155/2010/295394
- Devera, R., Fernandes, O., & Coura, J. R. (2003). Should *Trypanosoma cruzi* be called "cruzi" complex? a review of the parasite diversity and the potential of selecting population after in vitro culturing and mice infection. [Review]. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 98(1), 1-12.
- Dias, J., & Schofield, C. (1999). The evolution of Chagas disease (American trypanosomiasis) control after 90 years since Carlos Chagas discovery. [Historical Article]. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 94 Suppl 1, 103-121.
- Dvorak, J. A., & Hyde, T. P. (1973). *Trypanosoma cruzi*: interaction with vertebrate cells in vitro. 1. Individual interactions at the cellular and subcellular levels. *Exp Parasitol*, 34(2), 268-283.

- Dvorak, J. A., & Poore, C. M. (1974). *Trypanosoma cruzi*: interaction with vertebrate cells in vitro. IV. Environmental temperature effects. *Exp Parasitol*, 36(1), 150-157.
- Fernandes, A. B., Neira, I., Ferreira, A. T., & Mortara, R. A. (2006). Cell invasion by *Trypanosoma cruzi* amastigotes of distinct infectivities: studies on signaling pathways. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Parasitol Res*, 100(1), 59-68. doi: 10.1007/s00436-006-0236-6
- Franco-Paredes, C., Bottazzi, M. E., & Hotez, P. J. (2009). The unfinished public health agenda of chagas disease in the era of globalization. [Review]. *PLoS Negl Trop Dis*, 3(7), e470. doi: 10.1371/journal.pntd.0000470
- Garcia, E. S., Castro, D. P., Figueiredo, M. B., & Azambuja, P. (2012). Parasite-mediated interactions within the insect vector: *Trypanosoma rangeli* strategies. [Research Support, Non-U.S. Gov't Review]. *Parasit Vectors*, 5, 105. doi: 10.1186/1756-3305-5-105
- Garzón, E. A., Barnabe, C., Cordova, X., Bowen, C., Paredes, W., Gomez, E., . . . Guevara, A. G. (2002). *Trypanosoma cruzi* isoenzyme variability in Ecuador: first observation of zymodeme III genotypes in chronic chagasic patients. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 96(4), 378-382.
- Grijalva, M. J., Villacis, A. G., Ocana-Mayorga, S., Yumiseva, C. A., Moncayo, A. L., & Baus, E. G. (2015). Comprehensive Survey of Domiciliary Triatomine Species Capable of Transmitting Chagas Disease in Southern Ecuador. [Research Support, N.I.H., Extramural Research Support, Non-U.S. Gov't]. *PLoS Negl Trop Dis*, 9(10), e0004142. doi: 10.1371/journal.pntd.0004142

- Guzmán-Marín Eugenio, d. S. (1990). Los transmisores de la enfermedad de Chagas
Revista Biomedica 1(3), 144.
- Herrera, C., BARGUES, M. D., Fajardo, A., Montilla, M., Triana, O., Vallejo, G. A., &
Guhl, F. (2007). Identifying four *Trypanosoma cruzi* I isolate haplotypes from
different geographic regions in Colombia. [Research Support, Non-U.S.
Gov't]. *Infect Genet Evol*, 7(4), 535-539. doi: 10.1016/j.meegid.2006.12.003
- Hoare, C. (1972). *The Trypanosomes of Mammals*. Blackwell Scientific Publications,
768.
- Hotez, P. J., Bottazzi, M. E., Franco-Paredes, C., Ault, S. K., & Periago, M. R. (2008).
The neglected tropical diseases of Latin America and the Caribbean: a review
of disease burden and distribution and a roadmap for control and elimination.
PLoS Negl Trop Dis, 2(9), e300. doi: 10.1371/journal.pntd.0000300
- Kirchhoff, L. (1996). American trypanosomiasis (Chagas disease). *Gastroenterol Clin
North Am.*, 25(3), 517-533.
- Kropf, S. P. (2008). Carlos Chagas e os debates e controvérsias sobre a doença do
Brasil Oswaldo Cruz, 16, 205-207.
- Laurent, J. P., Barnabe, C., Quesney, V., Noel, S., & Tibayrenc, M. (1997). Impact of
clonal evolution on the biological diversity of *Trypanosoma cruzi*.
[Comparative Study]. *Parasitology*, 114 (Pt 3), 213-218.
- Lenzi, H. L., Castelo-Branco, M., Pelajo-Machado, M., Oliveira, D., & Gattas, C.
(1998). *Trypanosoma cruzi*: compromise of reproductive system in acute
murine infection. *Acta Trop.*, 71, 117-129.
- LS., F., & Brener, Z. (1987). Susceptibility and natural resistance of *Trypanosoma
cruzi* strains to drugs used clinically in Chagas disease.
Trans.R.Soc.Trop.Med.Hyg., 81, 755-759.

- Macedo, A. M., Machado, C. R., Oliveira, R. P., & Pena, S. D. (2004). *Trypanosoma cruzi*: genetic structure of populations and relevance of genetic variability to the pathogenesis of chagas disease. [Review]. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 99(1), 1-12.
- Macedo, A. M., Oliveira, R. P., & Pena, S. D. (2002). Chagas disease: role of parasite genetic variation in pathogenesis. [Research Support, Non-U.S. Gov't Review]. *Expert Rev Mol Med*, 4(5), 1-16. doi: doi:10.1017/S1462399402004118
- Macedo, A. M., & Pena, S. D. (1998). Genetic Variability of *Trypanosoma cruzi*: Implications for the Pathogenesis of Chagas Disease. *Parasitol Today*, 14(3), 119-124.
- Manoel-Caetano Fda, S., & Silva, A. E. (2007). Implications of genetic variability of *Trypanosoma cruzi* for the pathogenesis of Chagas disease. [Review]. *Cad Saude Publica*, 23(10), 2263-2274.
- Martin, D., & Tarleton, R. (2004). Generation, specificity, and function of CD8+ T cells in *Trypanosoma cruzi* infection. [Research Support, Non-U.S. Gov't Research Support, U.S. Gov't, P.H.S. Review]. *Immunol Rev*, 201, 304-317. doi: 10.1111/j.0105-2896.2004.00183.x
- Miles, M., Lanham, S., Souza, A., & Povia, M. (1980). Further enzymic characters of *Trypanosoma cruzi* and their evaluation for strain identification. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 74, 221-237.
- Miles, M. A., Llewellyn, M. S., Lewis, M. D., Yeo, M., Baleela, R., Fitzpatrick, S., . . . Mauricio, I. L. (2009). The molecular epidemiology and phylogeography of *Trypanosoma cruzi* and parallel research on *Leishmania*: looking back and to the future. [Research Support, Non-U.S. Gov't Review]. *Parasitology*, 136(12), 1509-1528. doi: 10.1017/S0031182009990977

- Miles, M. A., Toyne, P. J., Oswald, S. C., & Godfrey, D. G. (1977). The identification by isoenzyme patterns of two distinct strain-groups of *Trypanosoma cruzi*, circulating independently in a rural area of Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 71(3), 217-225.
- Moncayo, A. (1999). Progress towards interruption of transmission of Chagas disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 94 Suppl 1, 401-404.
- Monteiro, W. M., Margioto Teston, A. P., Gruending, A. P., dos Reis, D., Gomes, M. L., de Araujo, S. M., . . . Vale Barbosa, M. (2013). *Trypanosoma cruzi* I and IV stocks from Brazilian Amazon are divergent in terms of biological and medical properties in mice. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *PLoS Negl Trop Dis*, 7(2), e2069. doi: 10.1371/journal.pntd.0002069
- Mortara, R. A. (1991). *Trypanosoma cruzi*: amastigotes and trypomastigotes interact with different structures on the surface of HeLa cells. [Comparative Study Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Exp Parasitol*, 73(1), 1-14.
- Mortara, R. A., da Silva, S., Araguth, M. F., Blanco, S. A., & Yoshida, N. (1992). Polymorphism of the 35- and 50-kilodalton surface glycoconjugates of *Trypanosoma cruzi* metacyclic trypomastigotes. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Infect Immun*, 60(11), 4673-4678.
- Mortara, R. A., Procopio, D. O., Barros, H. C., Verbisck, N. V., Andreoli, W. K., Silva, R. B., & da Silva, S. (1999). Features of host cell invasion by different infective forms of *Trypanosoma cruzi*. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 94 Suppl 1, 135-137.
- Oliveira, E. C., Stefani, M. M., Luquetti, A. O., Vencio, E. F., Moreira, M. A., Souza, C., & Rezende, J. M. (1993). *Trypanosoma cruzi* and experimental Chagas'

disease: characterization of a stock isolated from a patient with associated digestive and cardiac form. *Rev Soc Bras Med Trop*, 26(1), 25-33.

PAHO. (2006). Quantitative Chagas disease estimates.

Piras, M. M., Henriquez, D., & Piras, R. (1987). The effect of fetuin and other sialoglycoproteins on the in vitro penetration of *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes into fibroblastic cells. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Mol Biochem Parasitol*, 22(2-3), 135-143.

Rassi, A., Jr., Rassi, A., & Marin-Neto, J. A. (2010). Chagas disease. [Review]. *Lancet*, 375(9723), 1388-1402. doi: 10.1016/S0140-6736(10)60061-X

Revollo, S., Oury, B., Laurent, J. P., Barnabe, C., Quesney, V., Carriere, V., . . . Tibayrenc, M. (1998). *Trypanosoma cruzi*: impact of clonal evolution of the parasite on its biological and medical properties. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Exp Parasitol*, 89(1), 30-39. doi: 10.1006/expr.1998.4216

Reyes, L. (1991). *Parásitos e Doenças Parasitárias do Homem nas Americas e na Africa*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A.

Rodriguez, A. M., Afchain, D., Santoro, F., Bazin, H., & Capron, A. (1983). Parasitological and immunological aspects of *Trypanosoma cruzi* infection in nude rats. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Z Parasitenkd*, 69(2), 141-147.

Roellig, D. M., & Yabsley, M. J. (2010). Infectivity, pathogenicity, and virulence of *Trypanosoma cruzi* Isolates from sylvatic animals and vectors, and domestic dogs from the United States in ICR strain mice and SD strain rats. [Research Support, N.I.H., Extramural Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Am J Trop Med Hyg*, 83(3), 519-522. doi: 10.4269/ajtmh.2010.09-0663

- Schofield, C. J., & Kabayo, J. P. (2008). Trypanosomiasis vector control in Africa and Latin America. *Parasit Vectors*, 1(1), 24. doi: 10.1186/1756-3305-1-24
- Stuart, K., Brun, R., Croft, S., Fairlamb, A., Gurtler, R., Reed, E., & Tarleton, R. (2008). Kinetoplastids: related protozoan pathogens, different diseases. *The Journal of clinical Investigation*, 118(4), 1301–1310.
- Tanowitz, H., Wittner, M., Kress, Y., & Bloom, B. (1975). Studies of in vitro infection by *Trypanosoma cruzi*. I. Ultrastructural studies on the invasion of macrophages and L-cells. [Research Support, U.S. Gov't, P.H.S.]. *Am J Trop Med Hyg*, 24(1), 25-33.
- Teixeira, N., Guimaro, G., & Santos, B. (2006). Review: Chagas disease. *Chagas disease*, J;82(788-789).
- Tibayrenc, M., & Breniere, S. F. (1988). *Trypanosoma cruzi*: major clones rather than principal zymodemes. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 83 Suppl 1, 249-255.
- Tibayrenc, M., Neubauer, K., Barnabé, C., Guerrini, F., Skarecky, D., & Ayala, F. (1993). Genetic characterization of six parasitic protozoa: parity between random-primer DNA typing and multilocus enzyme electrophoresis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 15:90, 1335-1339.
- Toledo, M. J., de Lana, M., Carneiro, C. M., Bahia, M. T., Machado-Coelho, G. L., Veloso, V. M., . . . Tafuri, W. L. (2002). Impact of *Trypanosoma cruzi* clonal evolution on its biological properties in mice. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Exp Parasitol*, 100(3), 161-172.
- Villacis, A. G., Arcos-Teran, L., & Grijalva, M. J. (2008). Life cycle, feeding and defecation patterns of *Rhodnius ecuadoriensis* (Lent & Leon 1958) (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) under laboratory conditions. [Comparative Study Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 103(7), 690-695.

- Wallace, A., Ortiz, S., Sanchez, G., Villagra, R., Muga, M., & Solari, A. (2001). Studies on parasitemia courses and mortality in mice infected with genetically distant *Trypanosoma cruzi* clonets. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Biol Res*, 34(2), 83-90.
- Watkins, R. (1966). Comparison of infections produced by two stains of *Trypanosoma cruzi* in mice. *J Parasitol*, 52(5), 958-961.
- WHO. (2012). Retrieved from <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/es/>.
- Yoshida, N., & Cortez, M. (2008). *Trypanosoma cruzi*: parasite and host cell signaling during the invasion process. [Review]. *Subcell Biochem*, 47, 82-91.
- Zingales, B., Andrade, S. G., Briones, M. R., Campbell, D. A., Chiari, E., Fernandes, O., . . . Schijman, A. G. (2009). A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. [Consensus Development Conference]. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 104(7), 1051-1054.

8 CAPITULO VIII: ANEXOS

Anexo 1. Preparación del medio de cultivo liquido LIT.

Para un litro de LIT, en 900 ml de agua, se disolvieron 3 g de Infusion de hígado DIFCO™, 5 g de triptosa DIFCO™, 2 g de dextrosa DIFCO™ (todos Becton Dickinson & Co., Sparks, MD, USA), 4 g de NaCl, 0,4 g de KCl y 8 g de Na₂HPO₄ (dibásico), y se ajustó el pH a 7,2. Posteriormente, se agregaron 25 mg/ml de solución de hemina (NaOH 1 N). Se incubó durante una hora, a 68 °C, en baño maría y se permitió enfriar. Una vez lista la mezcla, se añadieron 100 ml de suero fetal bovino (FBS) HyClone® (South HyClone, Utah, USA) inactivo por calor, 1 ml de penicilina/estreptomicina Cellgro® (Mediatech, Inc, Heindon, VA, USA) y 1 ml de gentamicina Gibco™ (Invitrogen corporation, Grand Island, NY, USA). Finalmente, se filtró el contenido en filtros desechables de 0,2 um de diámetro de poro VWR™, se almaceno a 4 °C.

Anexo 2. Preparación de medio de cultivo DMEM 10 % DE FBS (pH 7,2).

Para la preparación de este medio de cultivo se utilizó 1 l de agua destilada ultra pura. En el agua se disolvieron 13,4 g de medio DMEM y 3,7 g de bicarbonato de sodio. Cuando la mezcla estuvo homogénea, se ajustó el pH con HCl a 7,2. En la cámara de flujo laminar tipo H, se filtró el medio con una bomba de vacío y filtros desechables estériles de 500 ml. Dentro de la cámara de flujo laminar también se colocaron 10 ml de penicilina/estreptomicina, 100 ml de FBS inactivado y 10 ml de piruvato de sodio al 2,2%.

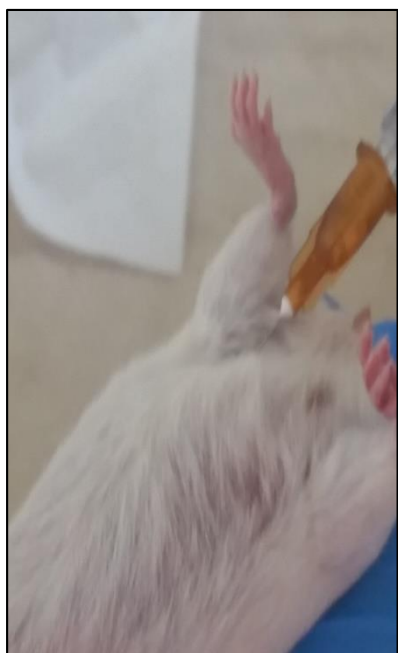
Nota: El medio DMEM 2 % FBS fue preparado de la misma manera.

Anexo 3. Preparación de PBS 1X en 1000 ml.

En un litro de agua destilada ultra pura, se disolvieron 8 g de NaCl, 0,2 g de KCl, 1,15 g Na_2HPO_4 y 0,2 g de KH_2PO_4 . El contenido fue auto clavado y mantenido a 4 °C. El pH se ajustó a 7,2

Anexo 4. Preparación de GIEMSA

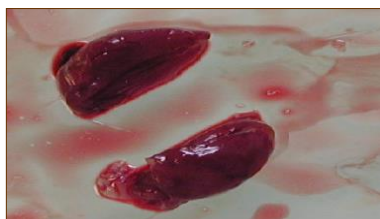
Solución GIEMSA de trabajo 10 ml, se preparó agua con un volumen de 990 ml, ajustando el pH 7,2 y se añadió tritón 5 %.

Anexo 5. Infección de parásito en ratones sensibles BALB/c

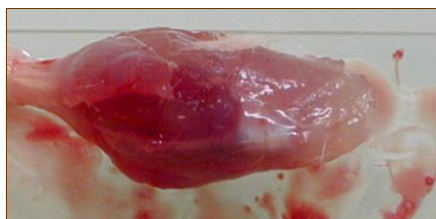
5 a. Inoculación de parásitos vía intraperitoneal



5 b. Corte de cole para extracción de sangre

Anexo 6: Recolección de corazón y cuádriceps

Corazón



Cuádriceps

Anexo 7: Preparación de paraformaldehído 4 % (50 ml, pH 7,2).

En una estufa a 60 °C se calentaron 32 ml de agua destilada. Se añadieron 2 g de paraformaldehído. Se agregaron 2 gotas de NaOH 2 N. Se ajustó el pH a 7,2 usando HCl. Finalmente, se añadieron 16 ml de PBS 3X estéril y se volvió a medir el pH. Este procedimiento fue realizado en una cabina de químicos y con guantes y aditamento de protección facial y ocular debido a la alta toxicidad del paraformaldehído.

Anexo 8: Prueba de ANOVA basada para un experimento de medias no repetitivas. Examen estadístico para analizar el crecimiento cinético del *Trypanosoma cruzi* de los tres grupos filogenéticos en forma epimastigote en medio de cultivo LIT, hasta el día 30.

Fuente	Suma de cuadrado tipo III	gl	Media cuadrada	F (DFn,DF d)	P valué
Grupos filogenéticos de <i>T. cruzi</i>	1,87E+16	9	2,07E+15	F (9, 18) = 3,80	P = 0,0077
Días de crecimiento	1,26E+16	2	6,31E+15	F (2, 18) = 11,6	P = 0,0006
Error	9,83E+15	18	5,46E+14		

Anexo 9: Prueba de significancia de Tukey. Realizado para analizar la diferencia en el crecimiento cinético del *Trypanosoma cruzi* de los tres grupos filogenéticos en forma epimastigote en medio de cultivo LIT, hasta el día 30.

Test de Tukey's multiple comparacion	Media diferencial	Significancia?	Resumen	P Value
3				
Tc IV vs. Tc V	152500	No	ns	> 0,9999
Tc I vs. Tc V	66000	No	ns	> 0,9999
Tc I vs. Tc IV	-86500	No	ns	> 0,9999
6				
Tc IV vs. Tc V	387000	No	ns	> 0,9999
Tc I vs. Tc V	243500	No	ns	> 0,9999
Tc I vs. Tc IV	-143500	No	ns	> 0,9999
9				
Tc IV vs. Tc V	-241000	No	ns	> 0,9999
Tc I vs. Tc V	9500	No	ns	> 0,9999
Tc I vs. Tc IV	250500	No	ns	> 0,9999
12				
Tc IV vs. Tc V	3770000	No	ns	0,9928
Tc I vs. Tc V	5020000	No	ns	0,9873
Tc I vs. Tc IV	1250000	No	ns	0,9992
15				
Tc IV vs. Tc V	46200000	No	ns	0,3629
Tc I vs. Tc V	41200000	No	ns	0,4421
Tc I vs. Tc IV	-4990000	No	ns	0,9875
18				
Tc IV vs. Tc V	90400000	SI	*	0,0345
Tc I vs. Tc V	76000000	No	ns	0,0814
Tc I vs. Tc IV	-14400000	No	ns	0,9012
21				
Tc IV vs. Tc V	81800000	No	ns	0,0582
Tc I vs. Tc V	105000000	SI	*	0,0134
Tc I vs. Tc IV	23600000	No	ns	0,7584
24				
Tc IV vs. Tc V	74700000	No	ns	0,0877
Tc I vs. Tc V	83400000	No	ns	0,0528
Tc I vs. Tc IV	8700000	No	ns	0,9626
27				
Tc IV vs. Tc V	76000000	No	ns	0,0818
Tc I vs. Tc V	51900000	No	ns	0,2834
Tc I vs. Tc IV	-24100000	No	ns	0,7505
30				
Tc IV vs. Tc V	75400000	No	ns	0,0844
Tc I vs. Tc V	57200000	No	ns	0,2212
Tc I vs. Tc IV	-18200000	No	ns	0,8474

Anexo 10: Prueba de ANOVA basada para un experimento de medias no repetitivas. Examen estadístico para analizar el egreso del tripomastigote de los tres grupos filogenéticos en células de mamífero (LLCMK₂), hasta los 25 días de post-infección.

Fuente	Suma de cuadrado III	de tipo	gl	Media cuadrada	F (DFn,DFd)	P valué
Grupos filogenéticos de <i>T. cruzi</i>	1,53E+11		6	2,55E+10	F (6, 12) = 0,652	P = 0,6887
Días de post-infección	1,27E+11		2	6,37E+10	F (2, 12) = 1,63	P = 0,2368
Error	4,69E+11		12	3,91E+10		

Anexo 11: Prueba de significancia de Tukey. Realizado para analizar la diferencia el egreso del tripomastigote de los tres grupos filogenéticos en células de mamífero (LLCMK₂), hasta los 25 días de post- infección.

Test de Tukey's múltiple comparación	Media diferencial	Significancia?	Resumen	P Value
7				
Tc V vs. Tc IV	0	No	ns	> 0,9999
Tc I vs. Tc IV	338000	No	ns	0,4709
Tc I vs. Tc V	338000	No	ns	0,4709
10				
Tc V vs. Tc IV	-9000	No	ns	0,9994
Tc I vs. Tc IV	760000	SI	*	0,0459
Tc I vs. Tc V	769000	SI	*	0,0433
13				
Tc V vs. Tc IV	-9000	No	ns	0,9994
Tc I vs. Tc IV	259000	No	ns	0,635
Tc I vs. Tc V	268000	No	ns	0,6158
16				
Tc V vs. Tc IV	-52000	No	ns	0,9812
Tc I vs. Tc IV	-52000	No	ns	0,9812
Tc I vs. Tc V	0	No	ns	> 0,9999
19				
Tc V vs. Tc IV	-14000	No	ns	0,9986
Tc I vs. Tc IV	-14000	No	ns	0,9986
Tc I vs. Tc V	0	No	ns	> 0,9999
22				
Tc V vs. Tc IV	-37000	No	ns	0,9904
Tc I vs. Tc IV	-37000	No	ns	0,9904
Tc I vs. Tc V	0	No	ns	> 0,9999
25				
Tc V vs. Tc IV	-314000	No	ns	0,5191
Tc I vs. Tc IV	-378000	No	ns	0,3956
Tc I vs. Tc V	-64000	No	ns	0,9716

Anexo 12: Promedio de infecciones *in-vitro*. Forma amastigote de los tres grupos filogenéticos en células de mamífero (LLCMK₂), en 24 y 48 horas de post- infección.

Horas de post-infección	Infección intracelular-amastigote <i>Trypanosoma cruzi</i> I (Ecu 7)	Infección intracelular-amastigote <i>Trypanosoma cruzi</i> IV (Ecu 6)	Infección intracelular-amastigote <i>Trypanosoma cruzi</i> V (Ecu 4)
24	6,5	0	0
48	14,2	6,7	0

Anexo 13: Prueba de ANOVA basada para un experimento de medias no repetitivas. Examen estadístico para analizar la diferencia de promedio de infecciones *in-vitro* de los tres grupos filogenéticos en células de mamífero (LLCMK₂), en 24 y 48 horas de post- infección.

Fuente	Suma de cuadrado tipo III	gl	Media cuadrada	F (DFn,DFd)	P valúe
Grupos filogenéticos de <i>T. cruzi</i>	53,4	1	53,4	F (1, 2) = 3,36	P = 0,2081
Horas de post-infección	75,2	2	37,6	F (2, 2) = 2,37	P = 0,2971
Error	31,8	2	15,9		

Anexo 14: Prueba de significancia de Tukey. Realizado para analizar la diferencia de promedio de infecciones *in-vitro* de los tres grupos filogenéticos en células de mamífero (LLCMK₂), en 24 y 48 horas de post- infección.

Test de Tukey's múltiple comparación	Media diferencial	Significancia?	Resumen	P Valúe
24				
T.c. IV vs. T.c. I	-3	No	ns	0,865
T.c. V vs. T.c. I	-3	No	ns	0,865
T.c. V vs. T.c. IV	0	No	ns	> 0,9999
48				
T.c. IV vs. T.c. I	-7,5	No	ns	0,5069
T.c. V vs. T.c. I	-14,2	No	ns	0,2232
T.c. V vs. T.c. IV	-6,7	No	ns	0,5629

Anexo 15: Prueba de ANOVA basada para un experimento de medias no repetitivas. Examen estadístico para analizar las parasitemias de los tres grupos filogenéticos en ratones sensibles BALB/c durante 56 días de post- infección.

Fuente	Suma de cuadrado tipo III	gl	Media cuadrada	F (DFn,DFd)	P valué
Grupos filogenéticos de <i>T. cruzi</i>	8,04E+11	7	1,15E+11	F (7, 14) = 1,02	P = 0,4560
Días de post-infección	1,77E+12	2	8,84E+11	F (2, 14) = 7,88	P = 0,0051
Error	1,57E+12	14	1,12E+11		

Anexo 16: Prueba de significancia de Tukey. Realizado para analizar la diferencia de parasitemias de los tres grupos filogenéticos en ratones sensibles BALB/c durante 56 días de post- infección.

Test de Tukey's múltiple comparación	Media diferencial	Significancia?	Resumen	P Value
7,				
Tc V vs. Tc I	0	No	ns	> 0,9999
TC IV vs. Tc I	0	No	ns	> 0,9999
TC IV vs. Tc V	0	No	ns	> 0,9999
14,				
Tc V vs. Tc I	-385280	No	ns	0,701
TC IV vs. Tc I	-403200	No	ns	0,6783
TC IV vs. Tc V	-17920	No	ns	0,9992
21,				
Tc V vs. Tc I	-1090000	No	ns	0,0875
TC IV vs. Tc I	-1110000	No	ns	0,0818
TC IV vs. Tc V	-17920	No	ns	0,9992
28,				
Tc V vs. Tc I	-1250000	Si	*	0,0488
TC IV vs. Tc I	-1250000	Si	*	0,0471
TC IV vs. Tc V	-8960	No	ns	0,9998
35,				
Tc V vs. Tc I	-1370000	Si	*	0,0297
TC IV vs. Tc I	-1380000	Si	*	0,0286
TC IV vs. Tc V	-8960	No	ns	0,9998
42,				
Tc V vs. Tc I	-421120	No	ns	0,6555
TC IV vs. Tc I	-421120	No	ns	0,6555
TC IV vs. Tc V	0	No	ns	> 0,9999
49,				
Tc V vs. Tc I	-62720	No	ns	0,9904
TC IV vs. Tc I	-62720	No	ns	0,9904
TC IV vs. Tc V	0	No	ns	> 0,9999
56,				
Tc V vs. Tc I	0	No	ns	> 0,9999
TC IV vs. Tc I	0	No	ns	> 0,9999