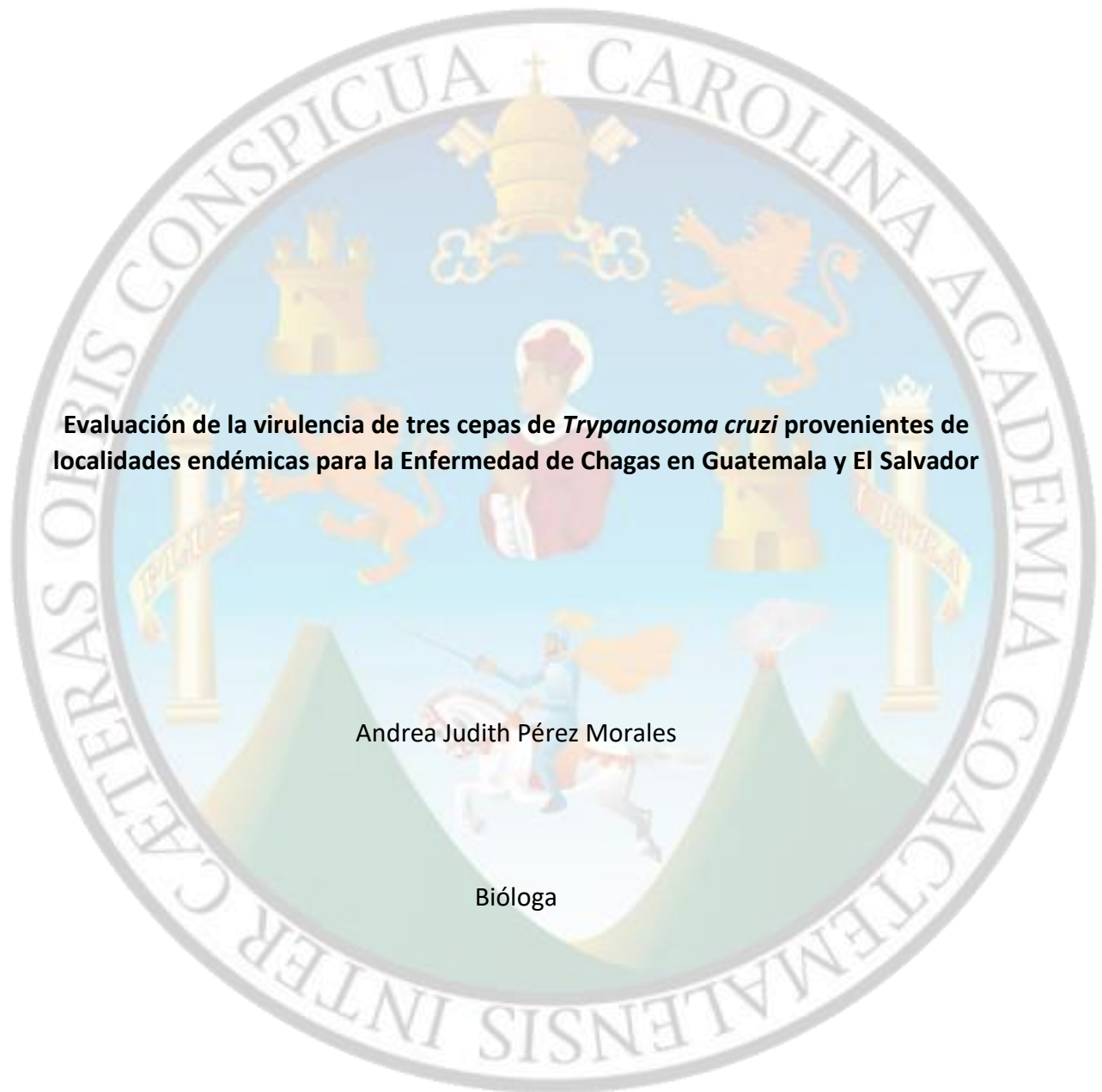


**UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA**  
**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA**



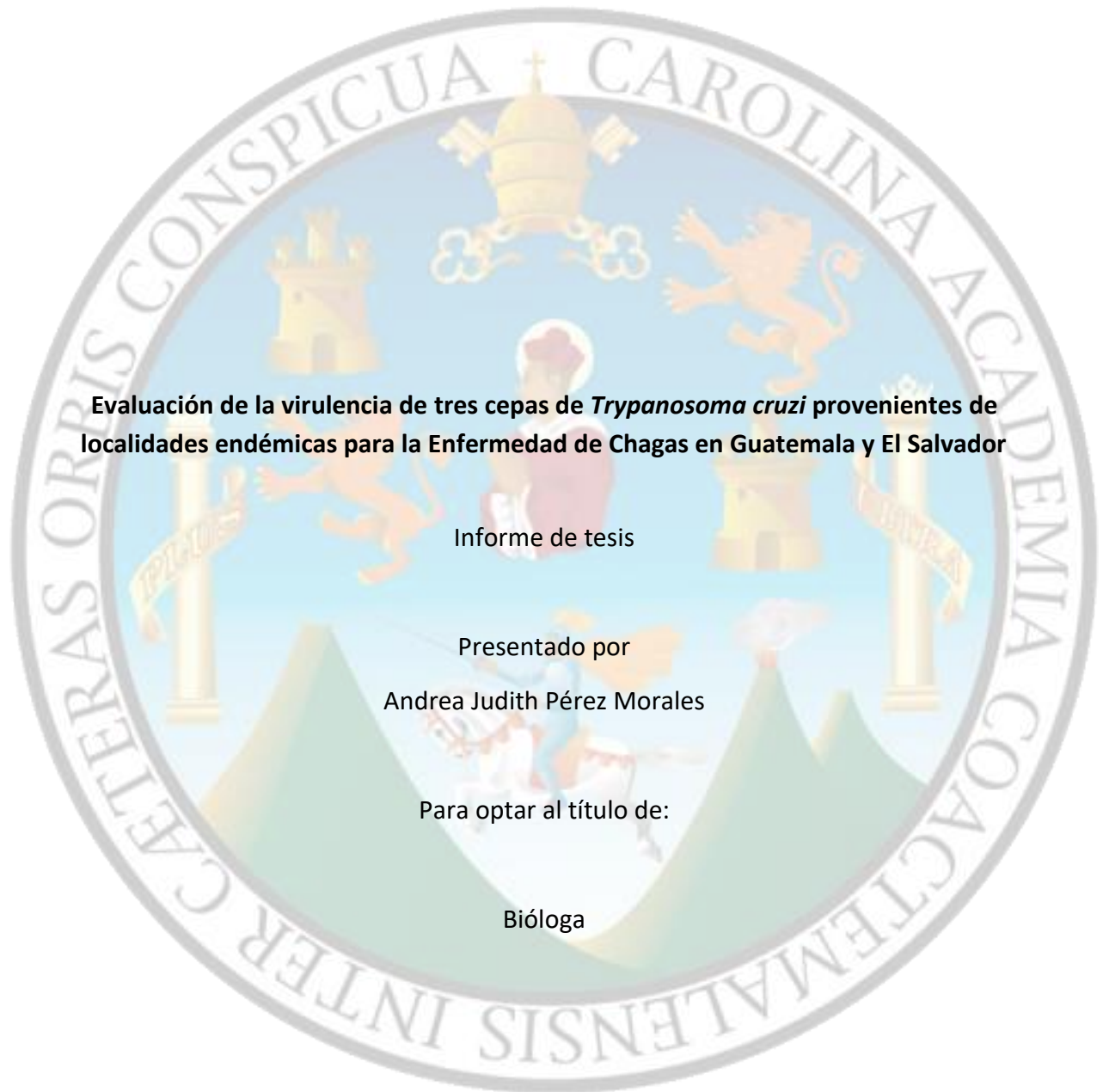
**Evaluación de la virulencia de tres cepas de *Trypanosoma cruzi* provenientes de localidades endémicas para la Enfermedad de Chagas en Guatemala y El Salvador**

Andrea Judith Pérez Morales

Bióloga

Guatemala, abril de 2022

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA  
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA



**Evaluación de la virulencia de tres cepas de *Trypanosoma cruzi* provenientes de localidades endémicas para la Enfermedad de Chagas en Guatemala y El Salvador**

Informe de tesis

Presentado por

Andrea Judith Pérez Morales

Para optar al título de:

Bióloga

Guatemala, abril de 2022

## JUNTA DIRECTIVA

M.A. Pablo Ernesto Oliva Soto	Decano
Licda. Miriam Roxana Marroquín Leiva	secretaria
Dr. Juan Francisco Pérez Sabino	Vocal I
Dr. Roberto Enrique Flores Arzú	Vocal II
Lic. Carlos Manuel Maldonado Aguilera	Vocal III

**Dedicado a:**

A Dios, quien ha sido mi guía a lo largo de mi vida, y mi lugar de reposo cuando siento desmayar. Sin Él no hubiera sido posible llegar hasta donde estoy el día de hoy.

A mis padres, Judith y Mario, quienes se esforzaron para que tuviéramos un mejor futuro con mis hermanos. Gracias a mi mamá por dedicar su vida al cuidado de sus hijos y enseñarnos el camino de Dios. También a mi papá por salir a trabajar y sacrificarse por pagar mis estudios.

A mis hermanos, Alejandro y Daniel, quienes me apoyaron en todo momento, y le bajaban el volumen a la televisión cuando yo necesitaba estudiar.

A mi esposo, mi reinicio de vida. Quien fue mi acompañante durante la universidad y me ayudó a no rendirme en este proceso.

A Meme, mi abuelito, quién me heredó el amor y la pasión para estudiar lo que uno ama.

## Agradecimientos

A Dios, a quien le debo todo. A pesar de mis errores siempre está dispuesto a darme una mano para volver a levantarme para comenzar de nuevo.

A Guatemala, donde me siento muy agradecida y bendecida de haber nacido.

A la Universidad de San Carlos de Guatemala, por haberme brindado la educación pública y la oportunidad de estudiar en los salones de clases que en algún momento se convirtieron en mi segundo hogar.

A la facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, así como a la escuela de Biología por formar mi carrera y mostrarme que puedo hacer todo lo que me proponga.

A mis asesoras Bárbara y Eli, quienes me han enseñado tanto, me han brindado su amistad y gracias a ellas no puedo aspirar a nada más que a imposibles, porque constantemente están superando marcas y sueños. Muchas gracias por la paciencia que me han tenido, por los regaños, las correcciones, las desveladas, los trámites aduanales de los ratones, especialmente por su amistad. Ustedes siempre estarán en mis agradecimientos. Un especial agradecimiento a Mati y Amelia, quienes estuvieron en el proceso de la tesis y me recibieron de forma muy especial en mi estadía en México.

A mi revisora Antonieta y Carlota, muchas gracias por el apoyo a este trabajo, por las instalaciones del LENAP para trabajar con las chinches, porque siempre están dispuestas a ayudar a los estudiantes y también gracias por su apoyo con las autoridades de salud, por todas las dudas contestadas y hacer posible esta tesis.

Al Bioterio de la facultad de Farmacia “Amarillis Saravia”, y a su equipo de trabajo: Rodrigo Castañeda, Cristian Gonzales, Cristian López por ayudarme y enseñarme los procedimientos respectivos para el manejo de animales, así como a la gestión de la primer cepa CD-1 en Guatemala. Un especial agradecimiento a Sofía Marroquín, quien, durante su período de coordinación en el bioterio, proporcionó fondos que complementaron la compra de los ratones CD-1.

A Stanley y a su equipo de trabajo de la Universidad de El Salvador por el apoyo que recibí en ese bello país al momento del muestreo de triatominos infectados de la localidad de Santa Ana.

A la Dirección General de Investigación DIGI, quienes proporcionaron los fondos para que este trabajo se llevara a cabo.

A las Doctoras Paz María Salazar y Martha Bucio por permitirme aprender en su laboratorio en la Universidad Autónoma de México, junto a su equipo de trabajo: Berenice, Mariana, Olivia, Yolanda, Mauro y Elia. Muchas gracias por los conocimientos, por enseñarme el índice de metacicloquia, estadios de triatominos, electroforesis de proteínas, cortes histológicos, y también por su amistad y recibirme como una de ustedes.

A la asociación: “American Society of Tropical Medicine and Hygiene -ASTMH-”, por los fondos proporcionados al ganar el premio “ACGH Award for research support” con la presente tesis.

A mis amigos de la universidad, por hacer todo mejor, son muchos y estoy segura de que cada uno sabe quién es. Por las giras, por las desveladas, por las risas, por los regaños, por Calusac, por las salidas al mundo de a tres, por cada momento bueno y malo que pasamos y logramos terminar la carrera que tanto nos costó.

A mi familia, mis padres, hermanos, abuelos, tíos, primos, sobrinos, quienes alegran mi vida y de alguna manera contribuyeron para que lograra esta meta. Al final del día yo sé que puedo contar con cada uno de ustedes. También a un compañero muy especial, a mi perro Sponky, quien estuvo a lo largo de mi carrera universitaria y siempre me sacaba una sonrisa.

A mi esposo Abdel, quien es la pieza clave, quien estuvo presente desde el inicio de la tesis y me dio su apoyo incondicional, por muchos éxitos más. Por alegrarme la vida junto a nuestros perritos: Bruce, Chalupa y Chispa.

# ÍNDICE

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA	1
1. RESUMEN	9
2. INTRODUCCIÓN	11
3. ANTECEDENTES	14
3.1 Enfermedad de Chagas	14
3.2 Subfamilia Triatominae	16
3.3 <i>Triatoma dimidiata</i>	18
3.4 <i>Trypanosoma cruzi</i>	18
3.5 Metaciclologenia	20
3.6 Lugares de estudio	20
3.6.1 Guatemala	20
3.6.1.1 Jutiapa	21
3.6.1.2 Huehuetenango	22
3.6.2 El Salvador	23
3.7 Modelos murinos	24
4. JUSTIFICACIÓN	25
5. OBJETIVOS	27
5.1 General	27
5.2 Específicos	27
6. HIPÓTESIS	27
7. MATERIALES Y MÉTODOS	28
7.1 Universo	28
7.2 Muestra	28
7.2.1 Descripción de la muestra	28
7.3 Recursos materiales	28
7.3.1 Equipo	28
7.3.2 Recursos Biológico:	28
7.4 Métodos	29
7.4.1 Área de estudio	29
7.4.2 Muestreo de especímenes	29
7.4.3 Índice de metaciclologenia	29

7.5 Consideraciones éticas	31
7.6 Aislamiento de <i>T. cruzi</i> y expansión <i>in vivo</i>	31
7.7 Determinación de la virulencia de tres cepas de <i>T. cruzi</i> en grupos experimentales	32
7.8 Evaluación de cambios físicos	33
7.9 Histología	34
8. RESULTADOS	34
8.1 Índice de metaciclologenia	35
8.2 Determinación de la virulencia de <i>T. cruzi</i> en ratones	35
8.3 Características Físicas	39
* Diferencia significativa, $p < 0.05$ .	40
8.6 Disección del Bazo	41
8.7 Histología	43
9. DISCUSIÓN	48
10. CONCLUSIONES	53
11. RECOMENDACIONES	54
12. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	54



## 1. RESUMEN

La región fronteriza entre El Salvador y Guatemala ha sido un foco de atención debido a la diferencia en la agresividad de la enfermedad de Chagas. En el departamento de Jutiapa, a pesar de tener áreas vecinas con El Salvador, el número de casos agudos reportados son pocos en comparación con este, además, El Salvador presenta un alto número de casos, principalmente en la fase aguda. Por otro lado, Huehuetenango a pesar de no haber presentado ningún caso agudo de la enfermedad hasta el momento, ha presentado alta infección parasitaria en los triatominos. En los últimos años se han realizado estudios para determinar las propiedades biológicas de las cepas de *Trypanosoma cruzi*, utilizando modelos murinos, los cuales han demostrado que cada cepa de *T. cruzi* tiene distintos niveles de virulencia, así como diferentes niveles de daño histopatológico.

Con el objetivo de analizar la virulencia y características del progreso de la infección por tres cepas de *T. cruzi* provenientes de distintas localidades geográficas de Guatemala y El Salvador, en ratones CD-1, se calculó el índice de metaciclogenia de los triatominos muestreados, se realizaron curvas de parasitemia, se evaluaron las alteraciones físicas en los ratones infectados, tales como: cambio en el peso, tamaño de bazo, piloerección y arqueamiento dorsal, por último, se realizaron cortes histológicos de los órganos de los ratones infectados y se evaluaron al microscopio para la identificación de nidos de amastigotes y respuesta inmunológica del huésped.

Cada cepa presentó características muy claras desde la evaluación del número de parásitos dentro de los triatominos por medio del índice de metaciclogenia; seguido de la complejidad diferencial que presentó cada cepa en el establecimiento de la infección en ratones singénicos CD-1, y la progresión de la enfermedad, la cual fue evaluada lo más sistemáticamente posible, durante la fase aguda hasta la fase crónica (cuando fue posible).

La cepa de Santa Ana fue la cepa más virulenta, ya que se obtuvo el índice de metaciclogenia más alto con respecto a las demás localidades, se identificó un mayor número de parásitos

en la curva de parasitemia comparado con la localidad de Jutiapa, los ratones infectados tuvieron un índice de mortalidad del 100% a la mitad del experimento, los ratones macho presentaron piloerección y arqueamiento dorsal el máximo día de parasitemia. Con respecto al peso, se observó un aumento de peso durante el experimento, pero únicamente una hembra mostró diferencia significativa con respecto a su control en la prueba de Dunnet ( $p > 0.05$ ). Los ratones macho presentaron piloerección y arqueamiento dorsal durante el día de máxima parasitemia.

También se observó una expansión en longitud casi el doble del tamaño del bazo con respecto a los ratones control. Por último, se observaron nidos de amastigotes y presencia de infiltrado leucocitario y linfático en los órganos: corazón, músculo esquelético y cerebro. Al analizar la virulencia de la cepa de Santa Ana con los resultados anteriores, podemos determinar que la cepa se manifiesta con mayor virulencia en la fase aguda y por eso es posible hacer una detección temprana de la enfermedad.

La cepa de Jutiapa mostró menor virulencia que la cepa de Santa Ana, ya que el índice de metaciclogenia fue menor. Los ratones infectados con esta cepa llegaron a la fase crónica de la enfermedad y fueron sacrificados el día 69 del experimento. Con respecto al peso se mostró un leve aumento de peso durante el experimento, pero únicamente una hembra mostró un cambio de peso significativo con respecto a su control ( $p = 0.005$ ). Los machos infectados mostraron piloerección el día de máxima parasitemia. El bazo de los ratones infectados con esta cepa aumentó de tamaño en relación con su grupo control y no se observaron nidos de amastigotes, pero se observó presencia de infiltración celular de tipo linfocitario y lesiones fibróticas en la fase crónica de esta enfermedad. Esta cepa mostró un comportamiento similar a las cepas descritas para Latinoamérica, en donde los ratones llegan a la fase crónica de la enfermedad dejando evidencia de daño histológico.

La cepa de Huehuetenango, a pesar de tener un índice de metaciclogenia similar a la cepa de Jutiapa y de tener el conteo más alto de parásitos en comparación a las demás localidades, no logró desarrollar la infección en los ratones, únicamente se observó un sólo

parásito en el día 54 de un ratón infectado, siendo una cepa de baja virulencia ya que no fue capaz de provocar una infección en el hospedero mamífero.

Es importante mencionar que este es el primer reporte de la enfermedad de Chagas en un modelo murino de cepa CD-1 para Guatemala y El Salvador, en donde los resultados obtenidos concuerdan con el cuadro clínico observado en las localidades de estudio. La cepa de Santa Ana fue muy virulenta en la fase aguda como lo mostró el área bajo la curva en el día de máxima parasitemia, y en esa localidad se ha podido detectar la enfermedad en humanos en la fase aguda. La cepa de Jutiapa no fue tan virulenta, y en esta área geográfica no es usual detectar casos agudos para la enfermedad, muchos se han detectado en la fase crónica. Por último, la cepa de Huehuetenango tuvo baja virulencia, y en esta localidad se han reportado pocos casos de la enfermedad a lo largo de los años.

Este estudio sienta las bases para continuar el estudio sistemático de cepas centroamericanas de *T. cruzi*, en ratones singénicos, lo cual permite sumar a resultados de estudios de genética de poblaciones, morfológicos, y genómicos tanto de los vectores como del parásito; y así poder aproximarnos a una mejor comprensión de la progresión de la enfermedad y la virulencia de las cepas de *T. cruzi*, y así proponer estrategias de control más adecuadas para cada región.

## 2. INTRODUCCIÓN

La enfermedad de Chagas, causada por el parásito protozoo *T. cruzi*, es un problema de salud pública en Latinoamérica (Bonney, 2014), según la CDC de Estados Unidos, hay un estimado de 8 millones de personas infectadas en México, Centroamérica y Sudamérica (CDC, 2021) y el costo aproximado anual para una persona con enfermedad crónica es de \$4,059.00 en Latinoamérica (Lee, et. al., 2013). En las últimas décadas, el perfil epidemiológico de la enfermedad ha cambiado debido a movimientos migratorios humanos, producto de la urbanización (Perreira, et.al., 2013; Gascon, et. al., 2010; Castillo,

2017). Actualmente existe una preocupación con respecto a la carga económica, ya que se reportó una estimación de los costos globales de la enfermedad ascienden a \$7.19 billones por año.

En Centroamérica el número total de personas infectadas por la enfermedad se redujo de 1.8 millones en el año 2000 a 0.4 millones en el año 2010. Los países con la mayor prevalencia de la enfermedad son: Guatemala, El Salvador, Honduras y Nicaragua con más de 200,000 individuos infectados en cada país (Bern, et. al., 2011; Hotez, et. al., 2014), así mismo, se estima que en estos cuatro países más del 80% de la población está afectada con esta enfermedad (OMS, 2016).

En Guatemala 10 de los 22 departamentos del país han sido clasificados como regiones endémicas para Chagas debido a la prevalencia de la enfermedad, entre estos departamentos se encuentran Jutiapa y Huehuetenango (Chávez, 2015). En el Salvador, la región suroeste, (departamentos de Santa Ana, Sonsonate y Ahuachapán), es considerada como una región hiperendémica por la alta y constante incidencia de la enfermedad, ya que la incidencia de casos agudos supera los registros presentados en otras regiones de Latinoamérica (Sasagawa, et al., 2014).

La enfermedad de Chagas está clínicamente caracterizada por dos fases: aguda y crónica. La fase aguda, también llamada asintomática, está caracterizada por fiebre, dolor muscular, taquicardia, esplenomegalia, anorexia, algunas veces vómitos y diarrea (Laranja, et. al., & Miranda, 1956; Prata, 2001), en la fase crónica los síntomas son severos ya que se trata de complicaciones cardíacas e intestinales (Laranja, et. al., 1956; Prata, 2001).

En los últimos años se han realizado estudios para determinar las propiedades biológicas de las cepas de *T. cruzi*, utilizando modelos murinos, los cuales han demostrado que cada cepa de *T. cruzi* tiene distintos niveles de virulencia, así como diferentes niveles de daño histopatológico (Cruz, et. al., 2014; León, et. al., 2016; Rimoldi, et. al., 2012; Melquiades, et.

al. 2010; Espinoza, et. al., 2010). Sin embargo, a la fecha los esfuerzos para evaluar cepas en Centro América aún son pocos.

El presente trabajo es un estudio experimental comparativo, en el cual se evaluó la virulencia de tres cepas de *T. cruzi* provenientes de dos localidades de Guatemala y una El Salvador, en un modelo murino, utilizando ratones singénicos de la cepa CD-1. Se calculó el índice de metaciclogenia de los triatominos muestreados para establecer el grado de infección en estos vectores, dicho cálculo permite establecer la efectividad de un vector en la transmisión de *T. cruzi*. Estos resultados se compararon con los niveles de virulencia obtenidos para cada cepa evaluada, realizando curvas de parasitemia, al mismo tiempo se evaluaron las alteraciones físicas en los ratones infectados comparando contra sus controles a lo largo del experimento, también se realizaron cortes histológicos de estos órganos con contraste de hematoxilina/eosina y se evaluaron al microscopio para la identificación de parásitos en los mismos.

La cepa de El Salvador fue la más virulenta, observando en los ratones infectados con esta cepa, fuertes alteraciones y grave sintomatología en la fase aguda, cómo ha sido descrito en humanos (OPS, 2010); alcanzando niveles de agresividad sumamente altos, lo que condujo a la muerte de los ratones infectados con esta cepa justo a la mitad del experimento, también se observaron nidos de amastigotes en los órganos de estos ratones, como es característico en la fase aguda de la enfermedad (Cielo, et.al., 2016, Cruz, et. al, 2015, Rimoldi, et. al. 2011; Hernández, et. al., 1996).

En contraste en los ratones inoculados con la cepa muestreada de triatominos provenientes de Jutiapa, se observó leve cambio en el peso, poca piloerección y menos agresividad en la virulencia, estos ratones pudieron completar el experimento (69 días), pasando por la fase aguda y alcanzando la fase crónica. No se encontraron nidos de amastigotes en los órganos disectados en el día 69 del experimento, solamente infiltrado de células del sistema

inmunológico, lo cual es un indicativo de la fase crónica, que ya ha sido descrito (De Alba, 2020).

Finalmente, la infección no pudo mantenerse en ratones infectados con la cepa proveniente de Huehuetenango, a pesar de que los triatominos presentaron alto índice de metacicloquia. Esto podría estar sugiriendo una cepa menos virulenta. Es importante resaltar que es la primera vez que se utiliza un modelo murino (CD-1) para el estudio *In vivo* de la enfermedad de Chagas en Guatemala y El Salvador.

Estos resultados abren una puerta al conocimiento y comprensión de la virulencia de cepas de *T. cruzi* aisladas de las localidades de estudio, cabe resaltar que estas tres localidades están catalogadas dentro de las regiones endémicas para la enfermedad, y el panorama de la infección en mamíferos. Además, generar estudios de esta índole persiguen dar apoyo a las instituciones que administran salud pública a nivel nacional, encargadas de generar estrategias para el control de enfermedades como, en este caso la Enfermedad de Chagas tanto en Guatemala como en El Salvador.

### **3. ANTECEDENTES**

#### **3.1 Enfermedad de Chagas**

La enfermedad de Chagas o tripanosomiasis americana es causada por el parásito *T. cruzi*, y es un problema de salud pública en Latinoamérica (Guhl, 2009; OMS, 2020), donde se reportan un aproximado de 8 millones de personas infectadas (CDC, 2021). Además, está clasificada dentro de las 13 enfermedades desatendidas en el mundo por la Organización Mundial de la Salud -OMS- (OMS, 2016; Rassi, et. al., 2010). Esta enfermedad presenta factores de riesgos epidemiológicos asociados con las malas condiciones de vivienda, principalmente en las áreas rurales de toda la región latinoamericana (OMS, 2020; Hotez, et. al., 2014).

La enfermedad de Chagas consta de dos fases: aguda y crónica, la fase aguda dura de seis a ocho semanas y puede ser asintomática, los síntomas aparecen una o dos semanas posteriores a la infección por el parásito, tales como: fiebre, dolor muscular, taquicardia, esplenomegalia, signo de Romaña, anorexia, vómitos y diarrea (Laranja, et. al., 1956; OMS, 2020). La fase crónica comienza cuando la parasitemia es baja y el paciente comienza una latencia clínica, también se le llama forma indeterminada la cual puede durar de 10-30 años en la vida de una persona y afecta principalmente el corazón, esófago y colon (Prata, 2001).

Los pacientes son tratados con las drogas antiparasitarias: benznidazol y Nifurtimox, siendo el benznidazol el que posee el mejor perfil de seguridad y eficacia, por lo tanto, es usado en primera instancia (Rassi, et. al., 2010). Actualmente hay desafíos para el descubrimiento de nuevos fármacos y uno de estos desafíos está relacionado al grupo diverso de cepas de *T. cruzi* y su diversidad genética, pero se cree que en un futuro utilizando inteligencia artificial se pueda llegar al descubrimiento de mejores fármacos para esta enfermedad (Villalta & Girish, 2019).

La principal forma de transmisión de la enfermedad es a través de insectos pertenecientes a la familia Reduviidae de los géneros: *Triatoma*, *Rhodnius* y *Panstrongylus* (Gourbiere, et. al., 2012). Otras vías de transmisión son: transfusión sanguínea, transmisión vertical de madre a hijo, trasplante de órganos, transmisión oral a través de alimentos infectados con heces de triatominos (Guhl, 2009; Rassi, et. al., 2010). La vía de transmisión sanguínea ha cobrado mayor relevancia en los últimos años por ser una vía importante de expansión en la distribución de la enfermedad, a través de las migraciones humanas hacia países donde antes no existían reportes de la enfermedad (Pereira, et al., 2013; Gascon, et. al., 2010; Castillo, 2017).

Los insectos redúvidos son vectores que pueden encontrarse en los tres ciclos de transmisión que se superponen: doméstico, peri doméstico y selvático (Steverding, 2014). El ciclo doméstico perpetúa la infección en seres humanos, se presenta principalmente en viviendas rurales o periurbanas de mala calidad, con paredes de bahareque o adobe y techos de material vegetal (Guhl, 2009; Samuels, et. al., 2013). En el ciclo peridoméstico

intervienen gran variedad de mamíferos como roedores, marsupiales y perros, que entran y salen libremente de las viviendas, también los triatominos selváticos son atraídos hacia las casas por la luz y el alimento, este ciclo sirve de nexo entre los ciclos doméstico y selvático (Guhl, 2009). Finalmente, el ciclo selvático se ha descrito para los triatominos que habitan en cuevas, agujeros y raíces de árboles en ambientes silvestres (Steverding, 2014).

Debido a la variedad de ambientes en donde se pueden encontrar a los vectores y su asociación con las viviendas, se han tomado estrategias para controlar a este vector, entre ellas se encuentra el rociamiento con insecticidas y la mejora de vivienda (Samuels, et. al., 2013). Un estudio previo en dos departamentos de Guatemala mostró que la infestación domiciliar por chinches puede incrementar al doble en un período de 33 meses después del rociamiento con insecticidas (Nakagawa, et. al., 2003; Nakagawa, et. al., 2003). Esto ha creado la necesidad de desarrollar estrategias más efectivas para el control vectorial.

En Guatemala desde el año 2004 se ha implementado el enfoque EcoSalud, principalmente en los departamentos de Jutiapa y Chiquimula, ya que tienen los niveles más altos de infestación y se consideran puntos críticos de transmisión de *T. cruzi* a los humanos (Peterson, et. al, 2019). Este enfoque incluye cambios en las actitudes de las personas, educación, mejora de vivienda (revocado de paredes con materiales locales, mejora de piso), modificación de los ambientes doméstico y peri doméstico (redistribución en la vivienda de animales domésticos y de consumo), así como, actividades que disminuyan el deterioro de los bosques cercanos, y vigilancia epidemiológica llevada a cabo no sólo por personal del Ministerio de Salud, sino por colaboradores comunitarios, demostrando que ha sido el método más eficiente de disminución en la transmisión vectorial (Monroy, et. al, 2009; Peterson, et. al, 2019).

### **3.2 Subfamilia Triatominae**

Los triatominos (Hemiptera: Heteroptera: Reduviidae) conocidos como chinches besuconas, son los vectores de la enfermedad de Chagas, también conocida como Tripanosomiasis americana (Schofield, 1994). La mayoría de las especies, de 14 de 15



géneros conocidos, de esta subfamilia pertenecen al Nuevo Mundo, solamente el género *Linshcosteus* es endémico de Asia (Hypsa, et. al., 2002).

Estos insectos son hemimetábolos, los cuales se desarrollan de huevo a adulto, pasando por cinco etapas ninfales; siendo hematófagos obligados en todas sus fases de desarrollo (Jurberg & Galvao, 2006; Gourbiere, et. al., 2012). El desarrollo de huevo a adulto dura de 3 a 6 meses dependiendo de las especies y la frecuencia de alimentación; además, se ha estimado que pueden vivir de 6 meses a dos años (Beard, 2005).

Los estadios ninfales se diferencian del adulto en que carecen de alas y son sexualmente inmaduras, estos se pueden alimentar de las exuvias y toman sangre en algunas ocasiones (Llop, et. al., 2001), también se pueden alimentar de mamíferos terrestres o arbóreos, especialmente didélfidos (p.ej tacuazín) y roedores (p. ej ratones); otras se encuentran asociados con murciélagos, y algunas con aves (Lent & Wygodzinsky 1979). La probabilidad de que un triatomino se infecte con *T. cruzi* se incrementa de acuerdo con las veces que ingiere sangre, es por esto que los estadios más desarrollados (4to y 5to) y los adultos tienden a tener mayores tasas de infestación de parásitos (Rassi, et. al., 2010).

Solamente 20 especies de los géneros *Triatoma*, *Rhodnius* y *Panstrongylus* son particularmente relevantes para la transmisión de *T. cruzi* a humanos y epidemiológicamente se han considerado como los vectores más importantes a *Triatoma infestans*, *T. dimidiata*, *T. brasiliensis*, *Rhodnius prolixus* y *Panstrongylus megistus* (Gourbiere, et. al., 2012). Recientemente se ha descubierto una nueva especie del género *Triatoma* en Guatemala, la especie *T. Huehuetenanguensis*, de acuerdo con el lugar donde se encontró (Lima, R., et. al., 2019).

### **3.3 *Triatoma dimidiata***

*Triatoma dimidiata* se distribuye ampliamente en Belice, Colombia, Costa Rica, Ecuador, Guatemala, Honduras, México, Nicaragua, Panamá, Perú, El Salvador y Venezuela (Lent & Wygodzinsky 1979; Guhl 2009).

*T. dimidiata* se instala dentro de las casas, principalmente en las paredes de las habitaciones, cerca de las camas, en general no más de 1 m por encima del suelo. También son comunes detrás de los cuadros o los papeles de la pared, en la que cuelgan prendas o en objetos acumulados de diferentes tipos, pero por lo general sus colonias no superan una o dos docenas de individuos (Zeledón et al., 1975). En los alrededores de las casas, los insectos se encuentran ocultos en todo tipo de objetos almacenados, sobre todo en las pilas de madera para fuego y en gallineros, también es posible el transporte pasivo a las casas al introducir leña a los hogares para cocinar los alimentos (Zeledón et al., 1975), además, se ha demostrado que *T. dimidiata* es atraído por la luz (Lent & Wygodzinsky 1979).

### **3.4 *Trypanosoma cruzi***

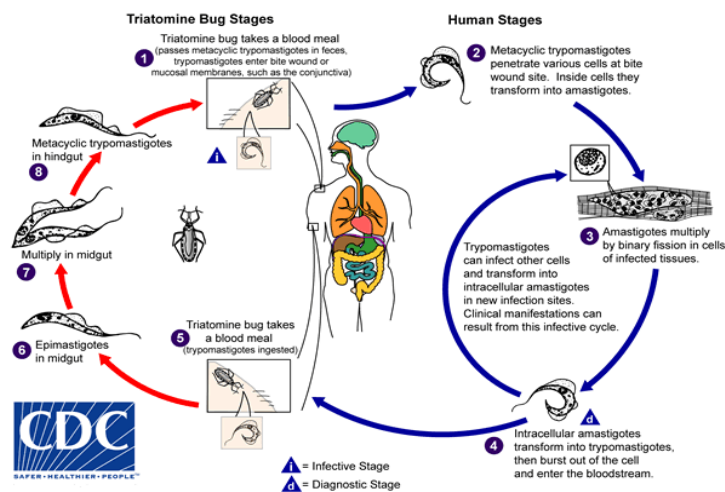
*T. cruzi* es un parásito protozoario y agente de la enfermedad de Chagas (Schofield, 1994), en América Latina, la principal forma de transmisión de este parásito es por contacto con las heces o la orina infectadas de triatominos que se alimentan por sangre (OMS, 2021).

El ciclo de vida de *T. cruzi* es complejo, requiere de dos intermediarios para poder desarrollarse: triatominos (vectores), y aves y/o mamíferos (huéspedes) (Rassi, et. al., 2010; Lent & Wygodzinsky 1979).

La mayoría de las infecciones en el humano se producen en las zonas rurales, en donde el parásito se transmite a través de las heces del triatomino infectado, ya que estos defecan rápidamente luego de haber ingerido sangre del vertebrado (Lent & Wygodzinsky 1979), *T. cruzi* ingresa a través de heridas en los tejidos de los vertebrados, de la mucosa de la boca, y especialmente en humanos por los ojos (Lent & Wygodzinsky 1979; OMS, 2021).

Los triatominos libres de parásito se infectan al ingerir sangre de vertebrados infectados, el parásito ingresa en la forma de tripomastigotes, luego se desplazan al intestino medio del insecto y allí se convierten en epimastigotes, por último, pasan al intestino posterior y allí se desarrollan a tripomastigotes metacíclicos, forma infectiva para los vertebrados (Tyler, & Engman, 2001; Rassi, et. al., 2010). Hasta la fecha no se ha demostrado que los triatominos sean afectados por el parásito (Rassi, et. al., 2010).

En el huésped vertebrado, los parásitos ingresan al organismo como tripomastigotes metacíclicos y se convierten en amastigotes una vez dentro, estos son capaces de parasitar un amplio rango de células nucleadas del mamífero, luego, estos se multiplican por fisión binaria y son capaces de infectar otras células y convertirse en amastigotes (Figura 1; Tyler & Engman, 2001). Al destruir las células infectadas se liberan los parásitos al torrente sanguíneo en forma de tripomastigotes (Schofield, 1994; Tyler, & Engman, 2001).



**Figura 1.** Ciclo de vida de *Trypanosoma cruzi*. Fuente: Centers for Disease Control and Prevention, 2017

*T. cruzi* presenta una amplia diversidad genética intraespecífica y es clasificada en seis unidades discretas de tipificación (DTUs) llamadas TcI-TcVI (Zingales et al., 2009), en Sudamérica se encuentran los 6 DTUs (Ramírez & Guhl, 2010), mientras que para Centroamérica se han reportado TcI y TcIV, más no incluye a Guatemala (Dorn, et. al., 2017).

### 3.5 Metaciclogenia

La metaciclogénesis es el proceso por el cual los epimastigotes no infecciosos se transforman en tripomastigotes metacíclicos, la forma patógena, este proceso ocurre naturalmente dentro del tracto digestivo del triatomino y es un paso crucial en el ciclo de vida de *T. cruzi*, ya que permite su propagación en hospederos vertebrados a partir de los triatominos vectores (Contreras, et. al., 1985). En estudios *in vivo* se ha observado que, durante la metaciclogénesis, los epimastigotes diferenciados se adhieren al epitelio del recto del triatomino antes de su transformación en tripomastigotes metacíclicos y colonizan el intestino medio y el recto del insecto, mientras que los tripomastigotes se encuentran principalmente en el recto, débilmente unidos a la cutícula rectal (Salazar, et. al., 2005).

El índice de metaciclogenia se obtiene a través del cociente del número total de tripomastigotes metacíclicos dividido entre el total de formas contadas en 100 campos, multiplicado por 100. Este cálculo permite establecer la efectividad de un vector en la transmisión de *T. cruzi* (Salazar, et. al., 2005).

### 3.6 Lugares de estudio

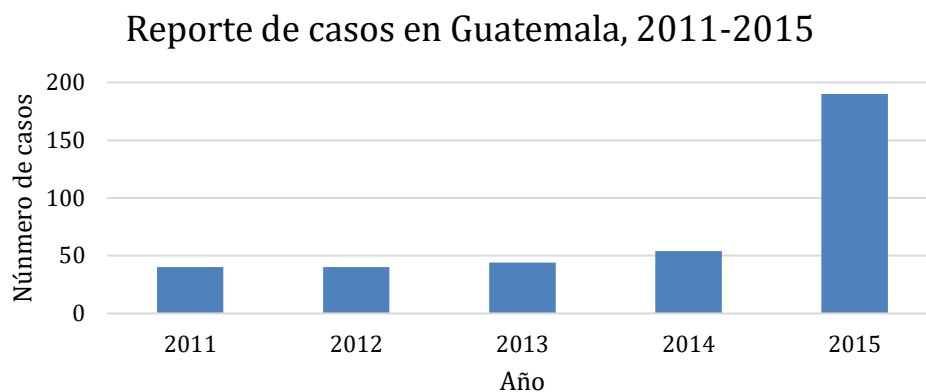
#### 3.6.1 Guatemala

La República de Guatemala está situada en el Istmo Centroamericano, entre los 14º y los 18º de latitud norte y los 88º y 92º de longitud oeste. Tiene fronteras al norte con México (960 Km), al oeste con Belice (266 Km), al este con el Mar Caribe (148 Km) y Honduras (256 Km), al sudoeste con El Salvador (203 Km) y al sur con el Océano Pacífico (254 Km) (Ministerio de Asuntos Exteriores y de Cooperación, 2016).

En 2008, Guatemala se convirtió en el primer país de Centroamérica en certificarse oficialmente como libre del vector *Rhodnius prolixus* (Hashimoto & Schofield, 2012), uno de los principales vectores de la enfermedad de Chagas. Sin embargo, *T. dimidiata* es el actual y principal vector, se encuentra presente en 21 de los 22 departamentos del país (Monroy

& Rodas, 2019), razón por la cual la especie ha sido el centro del control vectorial desde hace más de una década (Lucero, et. al, 2013). Por esta razón se han creado en el país sistemas de vigilancia entomológica con participación comunitaria en 637 localidades, así como otras estrategias en el marco de EcoSalud y EIC (Educación, información y Comunicación) (IPCA, 2012).

En el periodo 2011 al 2013 los casos reportados en Guatemala de la enfermedad de Chagas fue en promedio 41, entre 2014 al 2015 se evidencia aumento del reporte de 136 casos más, comparado con el año 2014 (Chávez, 2015), tal como se observa en la gráfica 1.



**Gráfica 1.** Casos reportados de Chagas durante los años 2011-2015 en Guatemala. Fuente: Ministerio de Salud Guatemala (Chávez, 2015).

### **3.6.1.1 Jutiapa**

El departamento de Jutiapa está ubicado al suroriente de la República de Guatemala; se ubica al este con la república de El Salvador, se encuentra a una altura que oscila entre 850 y 1832 msnm (Ministerio de economía de Guatemala, 2015). El clima en general es templado y hay zonas de tierra caliente. Jutiapa tiene varios ríos como el Río Paz que sirve de límite con la república de El Salvador, entre otros (Ministerio de economía de Guatemala, 2015).

Este departamento ocupa el primer lugar en el porcentaje de casos de la enfermedad de Chagas en el país, sin tomar en cuenta al departamento de Guatemala ya que es aquí, es donde se encuentran los hospitales especializados de referencia nacional y, por lo tanto, los

casos notificados pudieran ser de otros departamentos, debido a esto se observa un mayor número de casos reportados. Sin embargo, es notable que Jutiapa es el departamento con más reportes, los cuales representan el 31% de los casos (60/190) (Chávez, 2015), tal como se observa en la tabla 1.

**Tabla 1.** Casos de Chagas por departamento 2015.

Departamentos	Casos	Porcentajes
Alta Verapaz	1	0.5
<b>Huehuetenango</b>	<b>3</b>	<b>1.6</b>
El Progreso	3	1.6
Izabal	3	1.6
Santa Rosa	3	1.6
Baja Verapaz	3	1.6
Petén	10	5.3
Chiquimula	7	3.7
Guatemala	89	46.8
Zacapa	8	4.2
<b>Jutiapa</b>	<b>60</b>	<b>31.6</b>
Total	190	100

Fuente: Ministerio de Salud Guatemala (Chávez, 2015).

### **3.6.1.2 Huehuetenango**

El departamento de Huehuetenango se encuentra situado en la región VII o región Nor-occidental y limita al Norte y Oeste, con la República de México. Se ubica en la latitud 15° 19' 14" y longitud 91° 28' 13". Cuenta con una extensión territorial de 7,403 kilómetros cuadrados, y se encuentra entre 1,500 a 2,400 msnm (García, 2007).

Este departamento también se encuentra en el listado de casos reportados por la enfermedad de Chagas (Tabla 2), sin embargo, los reportes son pocos, solamente tres casos

durante el 2015 (Chávez, 2015). *T. dimidiata* ha sido reportado según el Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social, 2012 en 32 de los 33 municipios de Huehuetenango.

### 3.6.2 El Salvador

El Salvador limita al Norte y al Este con Honduras, al Oeste con Guatemala y al Sur con el Océano Pacífico, se encuentra entre 600 y 1000 msnm (Ministerio de Asuntos Exteriores y de Cooperación, 2016). Al igual que Guatemala, el principal vector que transmite la enfermedad de Chagas en El Salvador es *T. dimidiata*, ya que en el año 2010 se certificó la eliminación de *R. prolixus* en el país, y *T. dimidiata* se convirtió en el principal y aún activo transmisor (Organización Panamericana de la Salud, 2011). Actualmente, en el país se ha adquirido mejor conocimiento de esta enfermedad gracias al Programa de Control de la Enfermedad de Chagas, iniciado en el 2003 por el Ministerio de Salud, la Agencia de Cooperación Internacional del Japón (JICA) y la Organización Panamericana de la Salud (OPS/OMS). El Salvador ha reportado casos agudos para la enfermedad lo cual es inusual en Latinoamérica (Sasagawa, *et al.*, 2014).

#### 3.6.2.1 Santa Ana

El departamento de Santa Ana es una región hiperendémica de El Salvador, este se encuentra en la región oeste del país y colinda con Guatemala, específicamente con el departamento de Jutiapa. Este departamento ha sido el segundo que ha reportado más casos agudos de Chagas en el país durante los años 2,000-2012 (Sasagawa, *et al.*, 2014).

**Tabla 2:** Número de casos agudos de Chagas reportados en El Salvador por provincia, 2000-2012

Región	Provincia	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	Sub-total
Western	Ahuachapán	3	2	0	2	1	15	18	10	14	7	3	5	3	83
	Santa Ana	29	4	3	2	9	21	9	10	17	7	6	14	7	138
	Sonsonate	6	2	2	0	10	16	9	7	8	11	2	1	1	75
Central	Chalatenango	0	0	0	0	0	3	1	4	6	0	0	0	0	14
	La Libertad	1	1	4	0	4	2	1	1	0	8	0	1	2	25

Metropolitano	San Salvador	6	19	5	19	17	24	32	60	20	8	0	0	1	211
Paracentral	Cuscatlán	0	1	0	0	0	3	7	2	4	3	2	0	1	23
	La Paz	0	0	0	0	0	2	0	0	5	2	0	0	0	9
	San Vicente	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	3
	Cabañas	0	0	16	0	0	2	2	2	2	3	0	0	0	27
Eastern	Usulután	0	0	0	0	2	4	5	0	2	4	2	1	0	20
	San Miguel	0	0	4	0	0	17	32	19	9	2	1	2	1	87
	Morazán	0	0	0	0	8	0	0	1	0	2	0	0	0	11
	La Unión	0	0	0	0	2	1	0	1	1	0	0	0	0	5

Fuente: Ministerio de Salud el Salvador en: Sawagawa et. al., 2014

### 3.7 Modelos murinos

El uso de modelos murinos es amplio en estudios de enfermedades humanas, debido a la similitud genética, celular e inmunológica (Nguyen & Xu, 2008, Demetrius, 2006), es por ello que los ratones han sido catalogados como un excelente modelo experimental para el estudio de la inmunidad celular y humoral inducido por la infección de *T. cruzi* (León, et. al., 2016).

Los ratones y los seres humanos comparten órganos y fisiología sistémica, así como experimentan muchas de las enfermedades comunes que sufrimos, las cuales tienen causas hereditarias tanto poligénicas como mendelianas (Nguyen & Xu, 2008).

En el 2011, se secuenciaron los genomas de 17 cepas de ratones, obteniendo la variación genómica de la mayoría de las cepas comúnmente usadas de ratones de laboratorio (Schofield, et. al., 2012). Las cepas: Balb/c y CD-1 (Figura 2) son las más comunes para modelar la enfermedad de Chagas en Sudamérica (Cruz, et. al., 2014; León, et. al., 2016; Rimoldi, et. al., 2012; Melquiades, et. A., 2010; Espinoza, et. al., 2010).



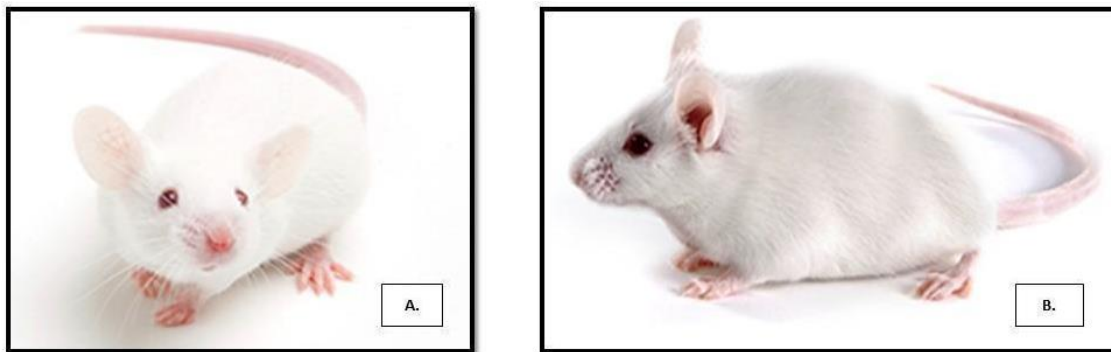


Figura 2. Ratones singénicos que han sido utilizados como modelos de la enfermedad de Chagas. (A) corresponde a la cepa Balb/c y (B) corresponde a la cepa CD-1.

En Guatemala hay un estudio de comparación de virulencia de cepas provenientes del departamento de Guatemala donde utilizaron un modelo murino, en el cual se concluyó una diferencia en virulencia entre cada localidad, siendo este el único estudio reportado en el país reportado utilizando estos modelos animales (Rodas, 1997).

#### 4. JUSTIFICACIÓN

La región fronteriza entre El Salvador y Guatemala ha sido un foco de atención debido a la diferencia en la agresividad de la enfermedad de Chagas. En el departamento de Jutiapa, a pesar de tener áreas vecinas con El Salvador, el número de casos agudos reportados son pocos (Chávez, 2015) en comparación con El Salvador, que además presenta alto número de casos, principalmente en la fase aguda (Sasawaga, 2014). Por otro lado, Huehuetenango a pesar de no haber presentado ningún caso agudo de la enfermedad hasta el momento, ha presentado alta infección parasitaria en los triatominos (Monroy & Rodas, 2019).

Reportes anteriores donde se evaluó la virulencia de cepas de *T. cruzi* en modelos murinos han demostrado que cada cepa de *T. cruzi* tiene distintos niveles de virulencia, algunas cepas tienen alta tasa de mortalidad y diferentes niveles de daño histopatológico (Cruz, et. al., 2014; León, et. al., 2016; Rimoldi, et. al., 2012; Melquíades, et. al. 2010; Espinoza, et. al., 2010), sin embargo, a la fecha los esfuerzos para evaluar cepas en Guatemala y El Salvador

son escasos, únicamente hay reportado dos estudios con modelos murinos y daño histopatológico en Guatemala (Hernández, 1996; Rodas, 1997).

Estudios previos han evaluado la importancia de trabajar con ratones de cepas puras para el estudio de la enfermedad de Chagas (Cruz, et. al., 2014; León, et. al., 2016; Rimoldi, et. al., 2012; Melquíades, et. al. 2010; Espinoza, et. al., 2010), esto debido a que el trasfondo genético juega un papel fundamental en la historia natural de la infección (León, et. al., 2016), en el presente trabajo se utilizó la cepa pura de ratón CD-1, la cual ha sido de las más recomendadas para modelar la enfermedad de Chagas (León, et. al., 2016).

Cabe destacar que en este trabajo se realizó una nueva metodología no reportada en Guatemala ni en El Salvador, donde se calcularon los índices de metaciclogenia, los cuales, en estudios anteriores han relacionado los altos índices de metaciclogenia con daño tisular (Salazar, et. al., 2005), con mayor seroprevalencia humana y con mayor virulencia en modelos murinos (Becerril, et. al., 2007), por ello fue relevante incluirlo en el estudio.

También, debido a que no hay reportes de estudios con modelos murinos de la cepa pura CD-1 en Guatemala ni en El Salvador, se realizaron curvas de parasitemia con ratones CD-1 provenientes de Charles River, USA. Durante el experimento se evaluaron características físicas de los ratones y por último se evaluaron los cortes histológicos de los ratones infectados con las cepas de las localidades de estudio, siendo este, el primer reporte de cortes histológicos de ratones de cepa pura para ambos países.

Los resultados obtenidos en este estudio abren una puerta al conocimiento y a la comprensión de la virulencia de cepas de *T. cruzi* aisladas de las localidades de estudio, cabe resaltar que estas tres localidades están catalogadas dentro de las regiones endémicas para la enfermedad. Además, es importante resaltar que el generar estudios de esta índole persiguen dar apoyo a las instituciones que administran salud pública a nivel nacional,

encargadas de generar estrategias para el control de enfermedades como, en este caso la Enfermedad de Chagas tanto en Guatemala como en El Salvador.

## 5. OBJETIVOS

### 5.1 General

- Analizar la virulencia y características de la infección de tres cepas de *Trypanosoma cruzi* provenientes de distintas localidades geográficas de Guatemala y El Salvador, en ratones CD-1.

### 5.2 Específicos

- Obtener y comparar el índice de metaciclogenia de los triatominos provenientes de las localidades de estudio.
- Comparar la virulencia de las cepas de *T. cruzi* de las localidades de Guatemala (Huehuetenango y Jutiapa) y El Salvador (Santa Ana), utilizando curvas de parasitemia.
- Describir la progresión de la infección por *T. cruzi* en los ratones CD-1 infectados, evaluando sus características físicas e histología de órganos.

## 6. HIPÓTESIS

Las cepas de *T. cruzi* aisladas de triatominos de Huehuetenango presenta la misma intensidad de virulencia que la cepa aislada de triatominos de El Salvador, y estas a su vez serán mayores que la de Jutiapa.

## 7. MATERIALES Y MÉTODOS

### 7.1 Universo

#### 7.1.2 Población

Parásitos *T. cruzi* en los triatomos muestreados en las viviendas de las localidades de Guatemala: Huehuetenango (municipio de Aguacatán), Jutiapa (municipio de Comapa) y El Salvador: Santa Ana (municipio de El Congo).

### 7.2 Muestra

#### 7.2.1 Descripción de la muestra

Parásitos aislados de los triatomos muestreados en viviendas de las localidades de los departamentos de Huehuetenango (municipio de Aguacatán), Jutiapa (municipio de Comapa) y El Salvador, Santa Ana (municipio de El Congo).

### 7.3 Recursos materiales

#### 7.3.1 Equipo

- Microscopio
- Micropipeta 100  $\mu$ L
- Micropipeta 10  $\mu$ L
- Cámara de Neubauer
- Porta y cubreobjetos
- Solución salina (85% NaCl)
- 10% formol
- PBS (Buffer Phosphate Saline)
- Pinzas
- Reactivo de Giemsa
- Metanol 100%
- Lanceta
- Bisturí
- Tubos con EDTA para hematología
- Jeringas 1ml
- Puntas de 10 y 100

#### 7.3.2 Recursos Biológico:

- 12 ratones singénicos de la cepa CD-1 provenientes

del laboratorio Charles River USA

## **7.4 Métodos**

### ***7.4.1 Área de estudio***

El estudio se realizó en dos localidades de Guatemala y en una localidad de El Salvador.

Las localidades muestreadas en Guatemala fueron: municipio de Aguacatán (1670 msnm) Huehuetenango y municipio de Comapa (1250 msnm) Jutiapa. En el caso de El Salvador, se muestreo el municipio el Congo (665 msnm) de Santa Ana (anexo 1).

### ***7.4.2 Muestreo de especímenes***

Guatemala: En Huehuetenango los especímenes fueron colectados por personal calificado del programa nacional de enfermedades transmitidas por vectores del Ministerio de Salud Pública de Guatemala, mientras que en Jutiapa los especímenes fueron muestreados por medio de personal del Laboratorio de Entomología Aplicada y Parasitología en conjunto con el personal de vectores del ministerio de salud.

El Salvador: El muestreo fue desarrollado en conjunto con la Universidad de El Salvador (UES) y el Ministerio de Salud de El Salvador.

En todas las localidades se utilizó el método hombre/hora, en el cual durante 30 minutos dos personas realizaron una búsqueda activa dentro y fuera de la casa, con ayuda de linternas y pinzas.

Los triatominos capturados fueron colocados en viales plásticos, un espécimen por vial, para evitar contaminación cruzada de parásitos.

### ***7.4.3 Índice de metaciclogenia***

El índice de metaciclogenia se obtuvo a través del procedimiento estandarizado por Becerril, Rangel, Imbert, Gómez & Figueroa, 2007 y Salazar, et. al. 2005, utilizando las

chinchas muestreadas en los lugares de estudio: Santa Ana (El Salvador), Jutiapa y Huehuetenango (Guatemala).

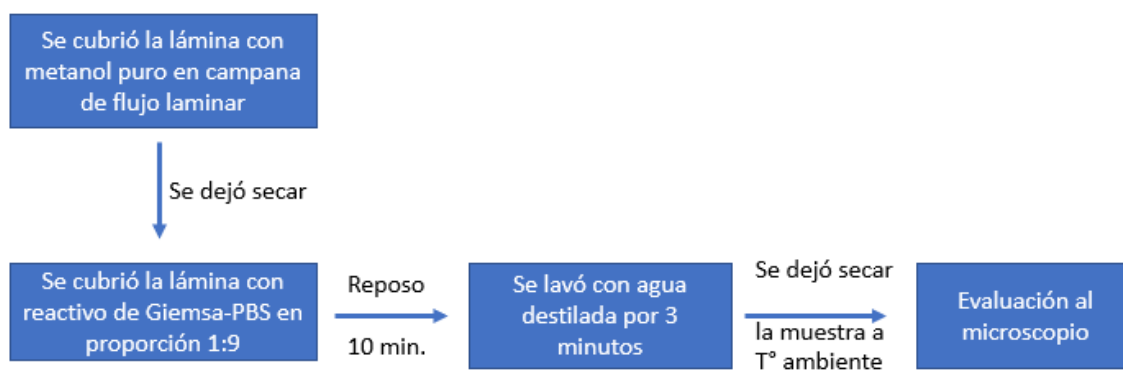
Para la localidad de Santa Ana se obtuvieron 10 triatomíneos, de los cuales solamente dos adultos hembras tuvieron presencia de parásito.

Para la localidad de Jutiapa se obtuvieron 30 especímenes, los cuales estuvieron infectados 8 triatomíneos, sin embargo, para mantener la igualdad de condiciones, se tomaron dos triatomíneos infectados, así como se obtuvo en Santa Ana.

Para Huehuetenango, únicamente se obtuvieron dos especímenes, los cuales uno estuvo infectado con parásito. El índice de metaciclografía solamente se realizó con un triatomíneo.

Las heces de los triatomíneos infectados se obtuvieron presionando su abdomen y se mezclaron, luego, estas fueron diluidas en solución salina al 85% y examinadas con un aumento de 400X en un microscopio óptico marca Nokia.

Las muestras positivas para *T. cruzi*, se fijaron en metanol puro en una campana de flujo laminar, siguiendo los protocolos descritos en la ficha de seguridad. Una vez secas, se agregó a las muestras el reactivo de Giemsa-PBS (1:9), luego se dejaron en reposo 10 minutos. Al pasar este tiempo, se lavaron con agua destilada durante 3 segundos (Becerril, et. al., 2007), por último, se dejaron secar a temperatura ambiente y se procedió a la evaluación al microscopio, tal como se observa en el diagrama de flujo.



**Figura 3.** Diagrama de flujo de tinción con Giemsa para muestras positivas al parásito *T. cruzi*.

Las muestras fueron examinadas por microscopía óptica a 400X, los parásitos fueron identificados y sus estadios fueron definidos, a través de criterio morfológico. Para calcular este índice primero se contaron 100 formas de parásito a un aumento de 400X, obtenido del cociente del número total de tripomastigotes metacíclicos dividido entre el total de formas contadas en los 100 campos, multiplicado por 100, como se muestra a continuación:

$$\text{índice de metaciclo} = \frac{\text{Número de tripomastigotes metacíclicos}}{\text{Total de formas contadas en 100 campos}} * 100$$

## 7.5 Consideraciones éticas

Este estudio se llevó a cabo en el Bioterio de La Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia “Amarillis Saravia” de la Universidad de San Carlos de Guatemala, con el aval de la junta directiva del Comité Institucional para el Cuidado y uso de Animales de Laboratorio (CICUAL) de Guatemala (Anexo 2).

## 7.6 Aislamiento de *T. cruzi* y expansión *in vivo*

Los ratones utilizados en este estudio fueron adquiridos del laboratorio de crianza de ratones singénicos Charles Rivers. Los ratones ingresaron por la Aduana Express Aéreo, COMBEX-IM, cumpliendo los procedimientos legales establecidos para el ingreso de animales al país, establecido por el MAGA. Luego fueron trasladados al bioterio Amarillis Saravia de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, en donde se reprodujeron para posteriormente realizar el experimento con la generación filial 1 o F1.

Para poder aislar las formas infectivas del parásito (tripomastigotes) en sangre, fue necesario infectar tres ratones hembra de la cepa CD-1 (6 semanas de edad, de 23-25g), uno por cada localidad muestreada.

Luego cada hembra fue inoculada intraperitonealmente con aproximadamente 5  $\mu$ L de heces diluidas en 200  $\mu$ L de solución salina al 85% de los triatominos infectados de cada una de las áreas de estudio (2 triatominos de Jutiapa, 2 de Santa Ana y 1 de Huehuetenango), las heces de los triatominos de cada localidad fueron mezcladas y luego diluidas. Luego, cuando se comenzaron a observar parásitos en sangre, se tomaron 5  $\mu$ L de sangre de la cola del ratón infectado diluidos en 95  $\mu$ L de PBS y se revisó y contó en una cámara de Neubauer si presentaba parásito y número.

Cuando se observó el parásito en sangre (aproximadamente a los 15-20 días post-infección), se procedió a anestesiar a los ratones con Xilacina-Ketamina (1:2), y se tomó una muestra de sangre del corazón (1 ml de sangre). Luego, se realizó una dilución de la sangre en solución salina al 85% (1:20) para el conteo en la cámara de Neubauer; obteniendo una concentración final de  $2 \times 10^4$  tripomastigotes/200  $\mu$ L.

### **7.7 Determinación de la virulencia de tres cepas de *T. cruzi* en grupos experimentales**

Para cada localidad se utilizó un grupo de 4 ratones (dos hembras y dos machos) de 6 semanas de edad con un peso de 25-30g, incluyendo un grupo control, sin infección.

Los ratones se inocularon intraperitonealmente con  $2 \times 10^4$  tripomastigotes/200  $\mu$ L y fueron evaluados tomando una muestra de sangre de la cola utilizando una lanceta aproximadamente 5 $\mu$ L cada 3 días durante 69 días. Los parásitos fueron contabilizados en una cámara de Neubauer por microscopía óptica a un aumento de 400X. Luego se realizaron las curvas de parasitemia con los conteos de parásitos, en las cuales en el eje X se reportó



la duración del experimento, mientras que en el eje Y se colocó la cantidad de parásitos contabilizados en la cámara de Neubauer, utilizando la siguiente fórmula:

$$\text{Concentración} = \frac{\text{número de células} \times 10.000}{\text{número de cuadros} \times \text{dilución}}$$

Se calculó el área bajo la curva de cada ratón infectado en el día de máxima parasitemia, para hacer una comparación de virulencia entre cepas. Este cálculo se realizó en el programa GraphPad Prism 9.3.0.

También se calculó la curva de supervivencia de Kaplan-Meier, para evaluar la supervivencia de cada grupo infectado con las cepas de estudio. Este cálculo se realizó en el programa GraphPad Prism 9.3.0.

## 7.8 Evaluación de cambios físicos

Se evaluaron las siguientes características físicas: peso y medida del bazo de cada ratón infectado, así como su control. El peso se evaluó utilizando una balanza semi analítica cada 3 días, al mismo tiempo que se realizó la toma de muestra sanguínea, para llevar un control de la progresión de la enfermedad en los ratones.

También se evaluó la inflamación del bazo en los ratones infectados y en sus respectivos controles para observar la progresión de la enfermedad, esta evaluación se realizó por medio de un vernier al momento de la disección del animal post sacrificio, estos resultados se presentan en un cuadro comparativo de los ratones control versus, los ratones infectados.

Para la medida de peso de los ratones, se realizó una prueba de normalidad, luego una prueba paramétrica de ANDEVA y una prueba post-hoc de Dunnet para evaluar la diferencia significativa entre grupos a un nivel de significancia de 0.05. Las variables de piloerección y arqueamiento dorsal se reportaron como presencia/ausencia.

## 7.9 Histología

Los ratones infectados con la cepa de Jutiapa y del grupo de machos de El Salvador se sacrificaron humanitariamente por medio del anestésico pentobarbital sódico, con una sobredosis de 2 ml. Seguido de la eutanasia humanizada, se disectaron los siguientes órganos: corazón, hígado, bazo, esófago, intestino delgado, músculo esquelético y riñón (Becerril, et. al., 2008). En el caso de los ratones infectados con la cepa de El Salvador, los machos fueron sacrificados humanitariamente según el normativo del Bioterio de La Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia “Amarillis Saravia” de la Universidad de San Carlos de Guatemala, el día 21 debido a que se encontraban en mal estado de salud, y las hembras fallecieron el día 24 por el mismo motivo.

Los órganos fueron fijados en formaldehído al 10% embebidos en parafina. Se realizaron cortes histológicos para evaluar la presencia de nidos de amastigotes, utilizando la tinción Hematoxilina-Eosina. Se realizó un conteo de nidos de amastigotes en 100 campos para cada órgano a un aumento de 1000X, usando aceite de inmersión. Este proceso se realizó en el laboratorio de Biología de parásitos a cargo de la Dra. Paz María Salazar, de la Facultad de Medicina en la Universidad Nacional Autónoma de México -UNAM-.

## 8. RESULTADOS

A continuación, se muestran los resultados obtenidos de la evaluación de la virulencia entre los patógenos de las distintas localidades, por medio del índice de metaciclología, las curvas de parasitemia, diferencias observables en los cortes histológicos, el peso de los animales del estudio y variables binarias como arqueamiento dorsal y piloerección.

## 8.1 Índice de metaciclogenia

De las tres localidades de estudio mostradas en la tabla 4, los triatominos provenientes de la localidad de Santa Ana presentaron el mayor índice de metaciclogenia, es decir que al momento de ser evaluados se encontró un mayor número de formas infectivas (tripomastigotes) que de formas no infectivas (epimastigotes) en el vector.

A pesar de que los índices de metaciclogenia fueron similares entre los triatominos provenientes de Huehuetenango y Jutiapa, es importante resaltar que los vectores de Huehuetenango presentaron mayor número de parásitos totales con respecto a las demás localidades, siendo estos tripomastigotes, los cuales son la forma infectiva de la enfermedad (tabla 4).

**Tabla 4 Índice de metaciclogenia de las tres localidades de estudio**

Localidades de muestreo de triatominos	Número de epimastigotes	Número de tripomastigotes	Índice de metaciclogenia
Santa Ana (ES)	43	89	43/132 (67.42%)
Jutiapa (Gua)	18	25	18/43 (58.14%)
Huehuetenango (Gua)	60	102	60/162 (58.82%)

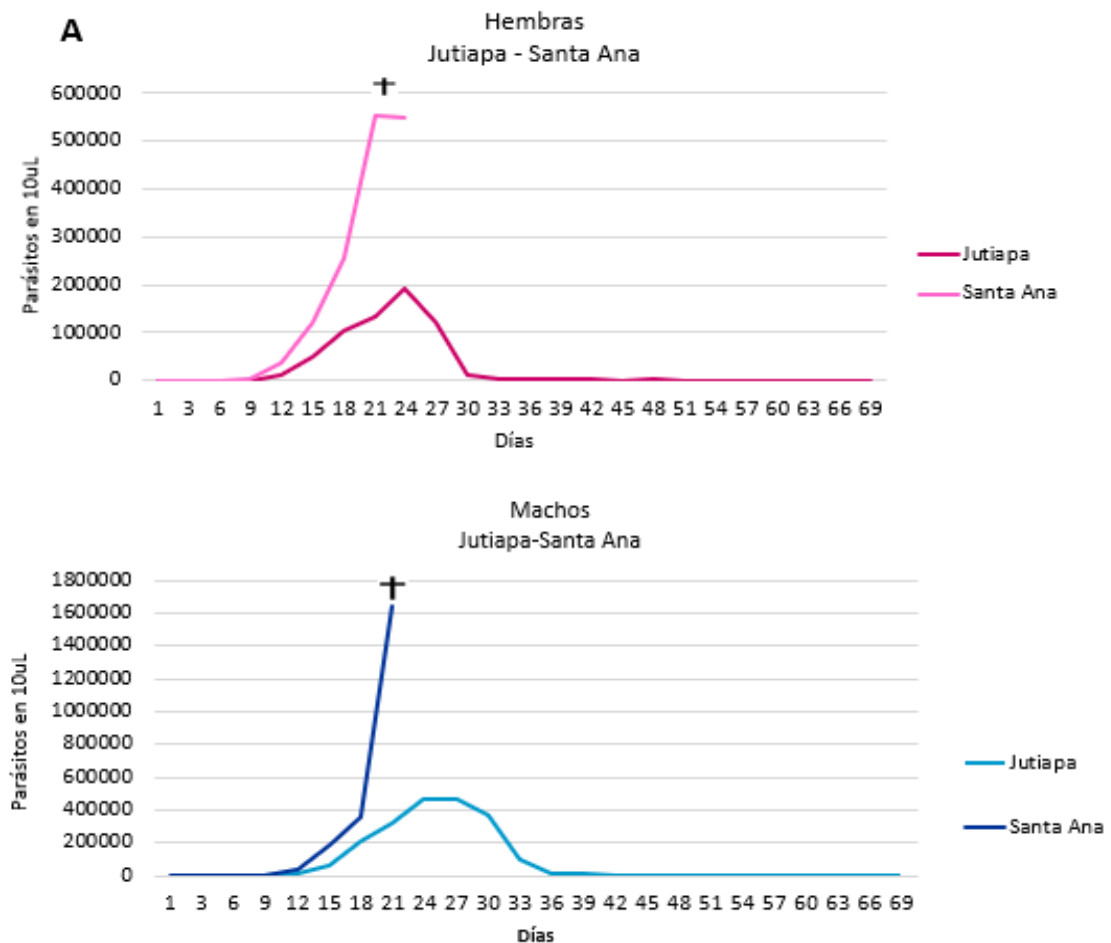
## 8.2 Determinación de la virulencia de *T. cruzi* en ratones

### 8.2.1 Curvas de Parasitemia

En la figura 4 se muestra la comparación de la curva de parasitemia entre sexos, en donde se observa una diferencia en el eje "Y" de la gráfica, el cual corresponde al número de parásitos, las hembras infectadas con la cepa de Jutiapa obtuvieron un número de parásitos en el día de máxima parasitemia de 190,000, las hembras infectadas con la cepa de El Salvador, 555,000 parásitos (figura 4A); los machos infectados con la cepa de Jutiapa y

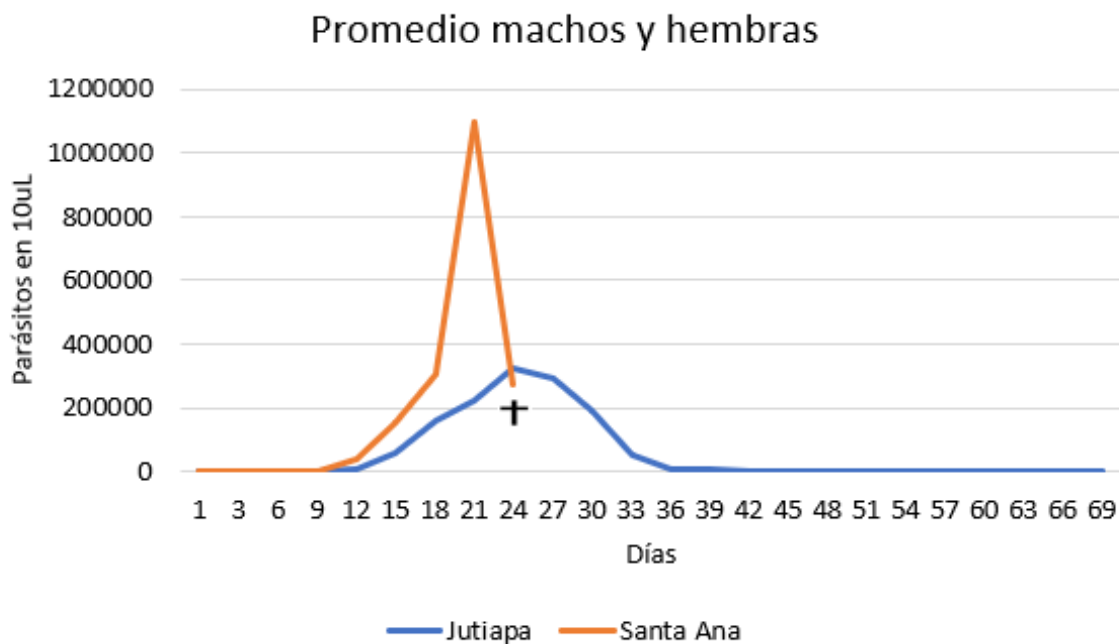
462,500 parásitos para los machos infectados con la cepa de Santa Ana, 1,637,500 (figura 4B).

En los ratones infectados con la cepa de Huehuetenango la infección no progresó, es decir que no presentaron parasitemia, únicamente se observó un parásito en el ratón infectado, por lo tanto, no se pudo continuar con la inoculación de parásitos al grupo de estudio.



**Figura 4. Curva de parasitemia machos y hembras de Jutiapa (Guatemala) y Santa Ana (El Salvador).** (A) Curvas de parasitemia de hembras de ambas localidades, (B) Curvas de parasitemia de machos de ambas localidades. El eje "Y" muestra el número de parásitos encontrados en 10 $\mu$ L, en una dilución 1:200. El eje "X" muestra el número de días del experimento. El símbolo (+) indica el día en que fallecieron los individuos.

En la curva de parasitemia de la figura 5, se muestran los promedios de machos y hembras de cada cepa. La cepa de Santa Ana fue la más virulenta ya que en el grupo de ratones infectados con dicha cepa se observó un elevado número de parásitos (1,800,000) hasta el día 24 del experimento, la cual corresponde a la fase aguda de la enfermedad y luego fallecieron. En comparación con la cepa de Jutiapa, en la cual se observó en su máxima parasitemia (450,000 parásitos) el día 27, el grupo de ratones infectados con dicha cepa llegaron a la fase crónica de la enfermedad en la cual ya no se encontraron parásitos circulando en sangre.

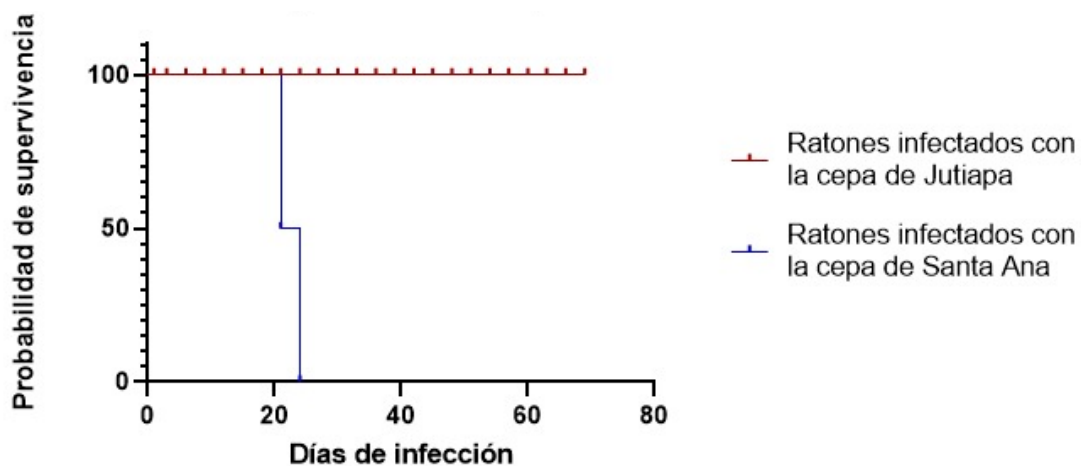


**Figura 5. Curva de parasitemia general (promedio machos y hembras).** En el eje "Y" se observa el número de parásitos encontrados en 10µL, en una dilución 1:200, mientras en el eje "X" el número de días del experimento. El símbolo (+) indica el día en que fallecieron los individuos.

La tabla 5 muestra el área bajo la curva de cada ratón por localidad el día de máxima parasitemia (anexo 3). Los ratones infectados con la cepa de la localidad de Santa Ana obtuvieron un mayor número de parásitos que la localidad de Jutiapa.

**Tabla 5. Área bajo la curva por localidad día máxima parasitemia de cada ratón infectado por localidad.**

	Jutiapa	Santa Ana
Ratón 1	4,717,500	5,880,000
Ratón 2	2,070,000	4,181,250
Ratón 3	1,402,500	2,242,500
Ratón 4	952,500	3,675,000



**Figura 6. Curva de supervivencia Kaplan-Meier.** El eje “x” corresponde a los días de infección y el eje “y” corresponde a la probabilidad de supervivencia.

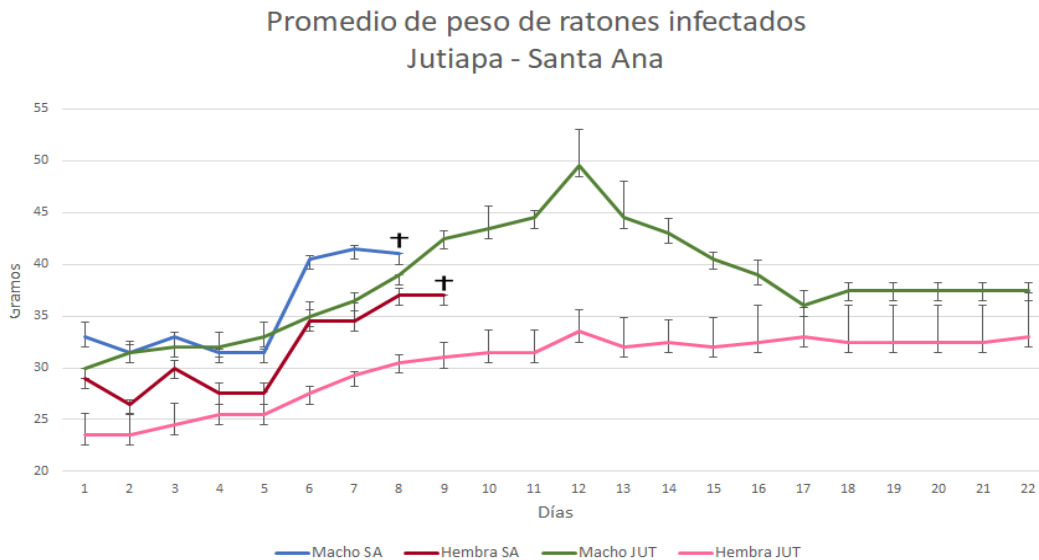
Los ratones infectados con la cepa de Jutiapa tuvieron una probabilidad de supervivencia del 100% ya que completaron los días del experimento, mientras que los ratones infectados con la cepa de Santa Ana tuvieron una probabilidad de supervivencia del 50% al día 21 y de 0% al día 24 (figura 6).

### 8.3 Características Físicas

Con el objetivo de describir la progresión de la enfermedad, se evaluaron las características físicas de los ratones infectados, entre ellas el peso, arqueamiento dorsal y piloerección, así mismo se evaluó el tamaño del bazo mediante disecciones y se analizaron cortes histológicos de diversos órganos con contraste Hematoxilina/eosina.

### 8.4 Peso

La figura 6 muestra el promedio de peso de ratones infectados por localidad y la desviación estándar por cada toma de muestra. Se observa que los ratones infectados con la cepa de Jutiapa llegaron a la fase crónica de la enfermedad, y un incremento de peso a la mitad del experimento. También los ratones infectados con la cepa de Santa Ana presentaron un aumento de peso, pero tuvieron un índice de mortalidad del 100% y no pudieron pasar a la fase aguda de la enfermedad (figura 7).



**Figura 7. Promedio de peso de ratones infectados con las cepas de Jutiapa y Santa Ana.**

En el eje “Y” se observan los gramos, mientras en el eje “X” el número de días del experimento. El símbolo (+) indica el día en que fallecieron los individuos. SA= Santa Ana, JUT=Jutiapa.

Se realizó una prueba de normalidad de Shapiro Wilks, identificando que los datos siguen una distribución normal con un valor de  $p > 0.05$  para ambas localidades (tabla 6).

**Tabla 6** Prueba de normalidad Shapiro Wilks. Peso ratones

DATOS	Valor “p” Santa Ana	Valor “p” Jutiapa
Peso	0.055	0.170

Fuente: Datos experimentales obtenidos en Rstudio 3.0.

Se realizó un análisis de varianza de una vía (ANDEVA), planteando la  $H_0$  que las medias son iguales y la  $H_a$  que al menos una de las medias es diferente con un nivel de confianza del 95%. Se obtuvo un valor de  $p < 0.005$ , se rechaza la  $H_0$  y, por lo tanto, existe diferencia significativa en el peso de los ratones de las localidades en estudio.

Posterior a esto, se realizó una prueba Post-Hoc de Dunnet, la cual permite hacer comparaciones múltiples de los grupos con respecto al control (Queen, Quinn & Keough, 2002). Se observó diferencia significativa entre el grupo hembra 1 de Jutiapa contra su control, y entre el grupo hembra 2 de Santa Ana contra su control. Los demás grupos no presentaron diferencias significativas (tabla 7).

**Tabla 7. Prueba Post Hoc de Dunnet**

Grupo	Promedio	Desviación estándar	Valor de “p”	
			Jutiapa	Santa Ana
Hembra1	29.049	3.665	0.051	0.082
Hembra 2	24.339	4.022	0.422	<b>0.005*</b>
Macho1	36.337	4.429	0.940	0.446
Macho2	29.058	4.785	0.736	0.874

\* Diferencia significativa,  $p < 0.05$ .



### 8.5 Arqueamiento dorsal y piloerección


Se observó presencia de arqueamiento dorsal y piloerección en los ratones macho infectados con la cepa de Santa Ana en el día de máxima parasitemia, el cual corresponde al día 24 del experimento. Así mismo se observó piloerección el día de máxima parasitemia de los ratones macho infectados con la cepa de Jutiapa, el cual corresponde al día 27 del experimento.




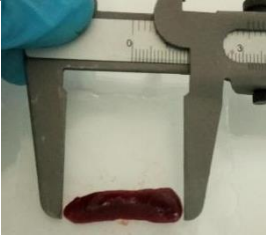



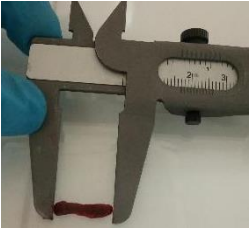
### 8.6 Disección del Bazo

Cómo parte de la evaluación de alteraciones de órganos, se realizó la disección del bazo de los ratones en estudio (tabla 8). Todos los ratones del grupo de Jutiapa presentaron esplenomegalia al compararlos con el grupo control, sin embargo, la hembra infectada 2 de la tabla 7, fue la que mayor esplenomegalia presentó ya que la medida del largo del bazo fue de 3 cm, y de los demás ratones fue de 2.7 cm, mientras que los ratones control presentaron una medida de 1.7 cm (tabla 8).

Los ratones macho de El Salvador, también presentaron esplenomegalia en comparación con su control, se debe resaltar que en este grupo infectado se observó que los bazos de ambos ratones sobrepasaron los 3 cm de largo, mientras que la medida del bazo del ratón control fue de 1.7cm (tabla 8).

**Tabla 8. Bazo de los grupos de estudio**

Muestra	Jutiapa	El Salvador
<p>Hembra infectada 1</p>	 <p>(2.7 cm)</p>	<p>N/A</p>

<p><b>Hembra infectada 2</b></p>	 <p>(3 cm)</p>	<p>N/A</p>
<p><b>Control hembras</b></p>	 <p>(1.7cm)</p>	<p>N/A</p>
<p><b>Macho infectado 1</b></p>	 <p>(2.7cm)</p>	 <p>(3.1 cm)</p>
<p><b>Macho infectado 2</b></p>	 <p>(2.7cm)</p>	 <p>(3.3 cm)</p>
<p><b>Control macho</b></p>	 <p>(1.7cm)</p>	 <p>(1.7cm)</p>

N/A = No fue posible evaluar el bazo de este grupo de ratones debido a que fallecieron y sus órganos estaban en muy malas condiciones.

Nota1: La diferencia de tamaños entre los bazos de Jutiapa y los de El Salvador se deben a un efecto de la fotografía y el instrumento de medición.

## 8.7 Histología

Para evaluar la virulencia de cada una de las cepas de estudio en los órganos de cada ratón infectado, se realizaron cortes histológicos y su posterior evaluación microscópica en: corazón, hígado, bazo, esófago, intestino delgado, músculo esquelético y riñón.

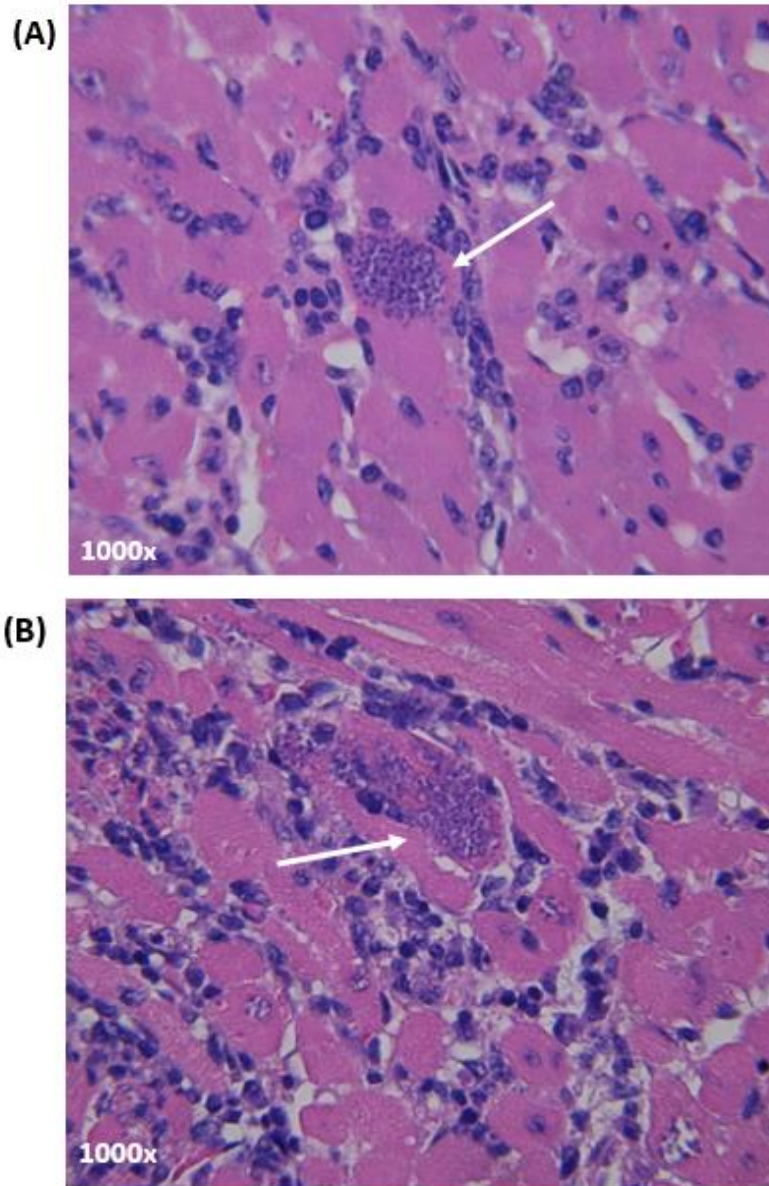
No fue posible hacer cortes de los órganos infectados del grupo de hembras de Santa Ana debido a que fallecieron antes de la toma de muestra y sus órganos se descompusieron.

En la tabla 9 es posible observar que únicamente los ratones infectados con la cepa de Santa Ana presentaron nidos de amastigotes en los órganos del corazón, músculo esquelético y cerebro, los cuales fueron cuantificados en 100 campos.

**Tabla 9.** Presencia de amastigotes en cortes de órganos de las cepas de estudio.

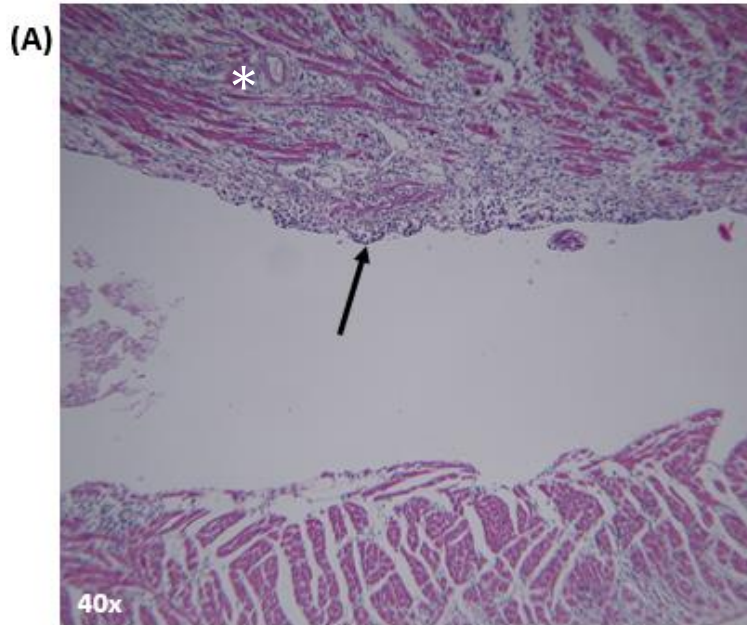
órgano	Cepa <i>T. cruzi</i>	Presencia de infiltrado	Presencia de amastigotes	Conteo amastigotes/100 campos
Corazón	Jutiapa	+	-	0
	Santa Ana	+	+	<b>107</b>
Músculo esquelético	Jutiapa	-	-	0
	Santa Ana	+	+	<b>15</b>
Cerebro	Santa Ana	+	+	<b>1</b>

En la figura 8A y B, se observan cortes histológicos de corazones provenientes de los ratones macho infectados con la cepa de Santa Ana en la fase aguda de la enfermedad, las flechas blancas indican los nidos de amastigotes más grandes que se encuentran en el corte, ya que también hay nidos de amastigotes más pequeños.



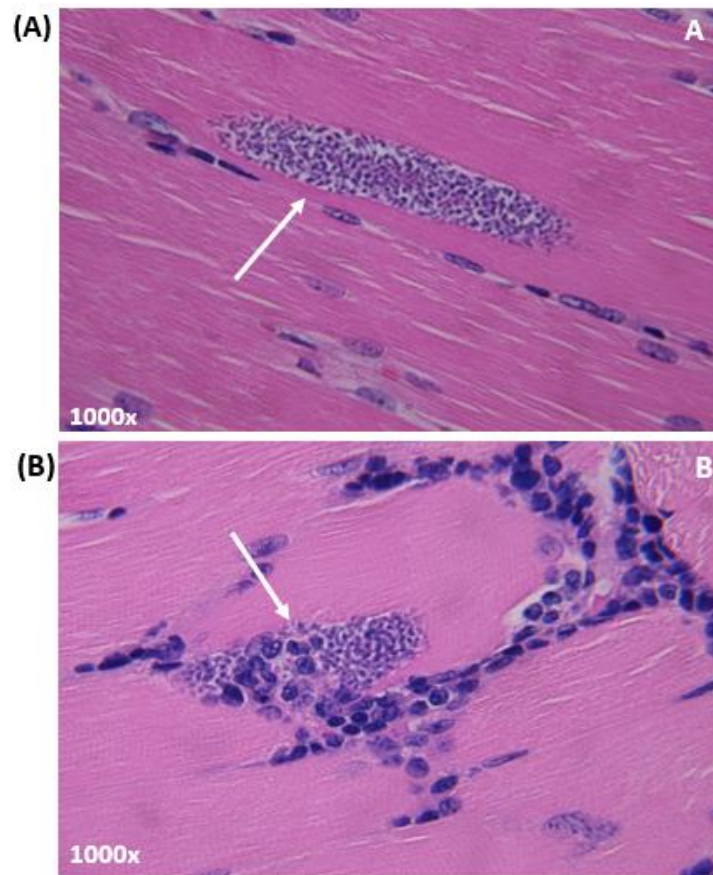
**Figura 8. Corte histológico de corazón de ratones CD-1 infectados con cepa de *T. cruzi* proveniente de Santa Ana.** Tinción Hematoxilina-Eosina. Las figuras A y B corresponden a un corte transversal del corazón de los dos machos infectados con la cepa de Santa Ana, y las flechas blancas señalan nidos de amastigotes claramente definidos.

En los órganos de los ratones provenientes de Jutiapa no se encontraron nidos de amastigotes, sin embargo, se observó en el corte histológico de corazón presencia de abundante infiltrado celular y fibrosis en el septo (figura 9; tabla 9), el cual se encuentra marcado con un asterisco de color blanco.



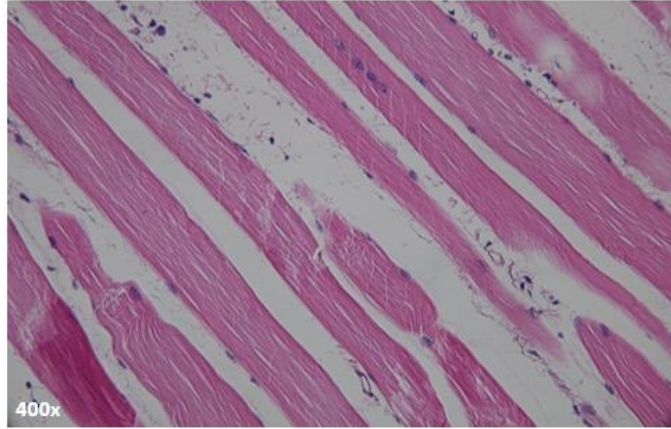
**Figura 9. Corte histológico de corazón de ratones CD-1 infectados con cepa de *T. cruzi* proveniente de Jutiapa.** La flecha negra señala la zona pericárdica con presencia de abundante infiltrado de tipo linfocitario y fibrosis en el septo. El asterisco blanco indica el septo.

En el corte histológico del músculo esquelético de los ratones macho infectados con la cepa de Santa Ana, en las figuras 10A y B se señalan los nidos de amastigotes mediante flechas blancas y en la figura 10b se observa infiltrado inflamatorio de tipo linfocitario y también se observan células macrófagas atacando un nido de amastigotes, esto se puede observar ya que las células linfocitarias se encuentran dentro del nido.



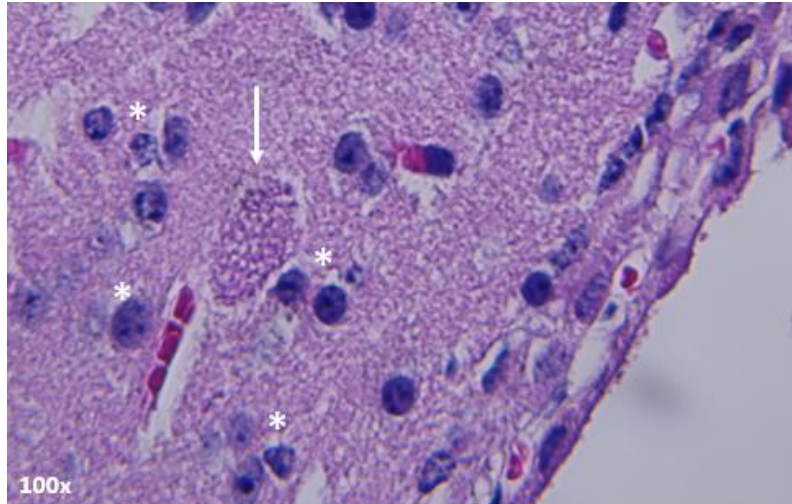
**Figura 10. Corte histológico de músculo esquelético de ratones CD-1 infectados con cepa de *T. cruzi* proveniente de Santa Ana.** Tinción Hematoxilina-Eosina. Las figuras A y B corresponden al músculo esquelético de dos machos de la cepa proveniente de Santa Ana. Las flechas blancas señalan nidos de amastigotes en las fibras del músculo liso. En la figura B se puede observar un infiltrado inflamatorio de tipo linfocitario atacando el nido de amastigotes, el cual se observa.

La figura 11 muestra un corte histológico de músculo esquelético de un ratón macho infectado con la cepa de Jutiapa, en esta figura no se observan nidos de amastigotes, y las fibras musculares se observan normales.



**Figura 11. Corte histológico de músculo esquelético de ratones CD-1 infectados con cepa de *T. cruzi* proveniente de Jutiapa.** Tinción Hematoxilina-Eosina. Se pueden observar fibras musculares normales, en las cuales no se observaron nidos de amastigotes.

En la figura 12 se observa mediante una flecha blanca, la presencia de un nido de amastigotes, este se encuentra de forma ovoide bien definida y se observa un eosinófilo, neutrófilos y macrófagos los cuales se marcan con \*



**Figura 12** Corte histológico transversal de cerebro de ratones CD-1 infectados con cepa de *T. cruzi* proveniente de Santa Ana. Tinción: Hematoxilina-eosina. La flecha blanca señala un nido de amastigotes.

## 9. DISCUSIÓN

La región fronteriza entre El Salvador y Guatemala ha sido un foco de atención debido a la diferencia en agresividad de la enfermedad de Chagas, lo cual abre nuevas preguntas del ¿por qué en El Salvador la enfermedad de Chagas reporta un gran número de casos agudos (Sasawaga, et. al., 2014) y en Guatemala han sido pocos (Chávez, 2015)? Solamente hay un estudio del parásito *T. cruzi* a nivel genético en estas regiones fronterizas, realizado por Solórzano, 2015, donde se obtuvo una alta diversidad genética del parásito entre ambas regiones.



Dentro los resultados obtenidos, los triatominos provenientes de la localidad de Santa Ana tuvieron el mayor índice de metaciclogenia en comparación con las demás localidades (tabla 4). En reportes anteriores han relacionado los altos índices de metaciclogenia con daño tisular (Salazar, et. al., 2005), con mayor seroprevalencia humana y con mayor virulencia en modelos murinos (Becerril, et. al., 2007). Los ratones infectados con dicha cepa reportaron números altos de parásitos en la curva de parasitemia (figura 4 y 5), los cuales tuvieron un índice de supervivencia del 0% en la fase aguda de la enfermedad (figura 5), este mismo comportamiento se observó en una cepa doméstica de Colombia, la cual fue muy agresiva provocando mortalidad en los ratones de estudio (Cielo, et.al., 2016).

En los cortes histológicos realizados en los órganos de los ratones infectados con la cepa de Santa Ana, se encontraron nidos de amastigotes en el corazón, músculo esquelético y en el cerebro, siendo este último un indicativo de una cepa muy virulenta. Según Burgos, et. al., 2010, el DTU TCI está asociado con encefalitis y daño al cerebro, según Dorn, et. al, 2017, este es el DTU que predomina en México y Centroamérica.

Los triatominos infectados con la cepa de Jutiapa y Huehuetenango mostraron índices de metaciclogenia similares entre sí (tabla 4), cabe resaltar que para la cepa de Huehuetenango solamente se identificó un parásito el día 54 en un ratón infectado, por lo que no fue posible desarrollar la infección en un grupo de 2 hembras y 2 machos, para continuar el experimento con esta cepa.

La cepa de Huehuetenango podría tratarse de una cepa de baja virulencia, ya que, aunque el índice de metaciclogenia es alto (tabla 4), no fue posible alcanzar la infección *in vivo*. Es necesario que esta cepa esté bajo vigilancia epidemiológica ya que en el año 2019 se reportó una nueva especie de triatomino en esta localidad (Lima, et.al., 2019), el cual podría convertirse en un vector de importancia epidemiológica al estar en contacto con alta parasitemia.

Por otro lado, los ratones infectados con la cepa de Jutiapa tuvieron una virulencia similar a lo reportado en la literatura con la mayoría de las cepas provenientes de Latinoamérica (Cruz, et. al, 2015 y Rimoldi, et. al., 2012), en donde los ratones sobrevivieron durante todo

el experimento. También se observó daño tisular en el corazón, con infiltrado linfocitario, pero sin presencia de nidos de amastigotes (tabla 8), lo cual indica que a pesar de que los ratones llegaron a la fase crónica de la enfermedad, no lograron resolver la misma ya que hubo un daño previo que indica que el tejido está dañado y posiblemente una disfunción cardíaca (De Alba, 2020).

La diversidad genética de las cepas de *T. cruzi* circulantes tienen características propias; entre ellas: la virulencia y capacidad patogénica (Osorio, et. al., 2012). En cuanto al análisis del número de parásitos evaluado en los ratones infectados con la cepa de Santa Ana y de Jutiapa, se observó diferencia en la curva de parasitemia entre estas localidades, ya que los ratones infectados con la cepa de Santa Ana tuvieron una mortalidad del 100% en la fase aguda (figura 6). El área bajo la curva (tabla 5) mostró un número mayor de parásitos en el día de máxima parasitemia en los ratones infectados con la cepa de Santa Ana en comparación con los ratones infectados con la cepa de Jutiapa, esto demuestra que la cepa de Santa Ana es más virulenta en su pico máximo de parasitemia, la cual corresponde a la fase aguda de la enfermedad y por esta razón es posible detectar los casos agudos en El Salvador, y en Guatemala es más difícil detectarlos.

Se observó una tendencia hacia el aumento de peso en los ratones durante la fase aguda de la enfermedad, la prueba de ANDEVA mostró diferencia significativa entre el peso de ambas localidades (Santa Ana y Jutiapa), la prueba de Dunnet demostró que hubo diferencia significativa solamente en las hembras de cada localidad ( $p = 0.005$ ), no se registró diferencia significativa en los machos mostrado en la figura 6. Es importante destacar que los ratones no bajaron de peso durante el experimento (figura 6), este parece ser un hallazgo interesante, ya que en otros estudios realizados por: Melquiades, et. al, 2010; Cabalén, et. al., 2016; Onofrio, et. al., 2015, han reportado una pérdida de peso durante la infección.

El aumento en el tamaño del bazo se ha relacionado directamente con la infección por *T. cruzi*, ya que este es un órgano implicado en la lucha contra la infección (Martín-Escolano, et. al, 2020), este se expande en conjunto con los ganglios linfáticos subcutáneos debido a

la activación y proliferación de las células T y B (De Meis, et. al., 2009). En este estudio se observó esplenomegalia (aumento del tamaño del bazo) en el 100% de los individuos infectados (tabla 7), con un aumento de tamaño casi del doble en los ratones infectados con la cepa de Santa Ana respecto a su control, los cuales se encontraban en la fase aguda de la enfermedad y con parásitos circulantes activos. Este es el primer reporte de aumento de bazo en ratones infectados con cepas de Guatemala y El Salvador en modelos murinos singénicos CD-1.

En humanos también existen pocos informes sobre la afectación del bazo en pacientes con la enfermedad de Chagas en Centroamérica, los cuales, se han basado en autopsias de pacientes en fase crónica de la enfermedad (De Meis, et. al, 2009), en los cuales se ha observado aumento de tamaño y de peso del bazo, con áreas aumentadas de folículos linfoides y fenómenos tromboembólicos (Pereira, et. al., 2002; Samuel, et. al., 1983).

En cuanto al análisis de los cortes histológicos y tinción de contraste hematoxilina/eosina, se observaron en los ratones infectados con la cepa de Santa Ana nidos de amastigotes en corazón, cerebro y músculo esquelético, mostrando preferencia de tropismo por parte del parásito hacia estos órganos (figuras 7, 9 y 11), es importante resaltar que se encontró un mayor número de nidos en el tejido del corazón (tabla 8), en donde se observó una pancarditis aguda, ya que las tres capas del corazón se vieron severamente afectadas (De alba, 2020). En la fase aguda de la enfermedad el daño al tejido del corazón se relaciona directamente con el parasitismo en los tejidos (Salazar-Schettino, et. al., 2016). Es importante resaltar que se han reportado casos de cardiomiopatías en El Salvador, tanto en adultos como en niños (OPS, 2010).

La presencia de nidos de amastigotes en el cerebro es un indicativo que la cepa es muy virulenta, ya que la migración a través de la barrera hematoencefálica es un proceso complejo, como ha sido reportado en otros estudios con *T. cruzi* en modelos murinos (Cielo, et.al., 2016, Cruz, et. al, 2015, Rimoldi, et. al. 2011; Hernández, et. al., 1996), así como en humanos (Alyemni, et. al, 2017), por lo que se puede concluir que la cepa de El Salvador tiene alto grado de virulencia ya que afecta este órgano.

Por el contrario, los ratones infectados con la cepa de Jutiapa alcanzaron la fase crónica de la enfermedad, presentando daño tisular del corazón, observando infiltrados leucocitarios y lesiones fibróticas (ver figura 8), en los cuales no se observaron nidos de amastigotes en ningún órgano (figura 11C) (De alba, et. al, 2020), lo cual concuerda con lo que se ha descrito para la fase crónica de la enfermedad en la cual se observaron escasos elementos parasitarios (De alba, et. al, 2020; Salazar-Schettino, et. al., 2016).

Dentro de las limitantes identificadas en este estudio, se listan las siguientes: a) Durante la realización de esta tesis hubo un cambio de autoridades en el ministerio de salud, lo cual complicó el seguimiento a la vigilancia entomológica y por ende disminuyó el muestreo de triatominos, b) La falta de políticas aduaneras para el ingreso de ejemplares de animales para investigación. c) Situaciones ajenas a la Universidad de San Carlos de Guatemala en las cuales se impidió el ingreso de personas al campus y debido a eso no se logró obtener los órganos de las hembras infectadas con la cepa de Santa Ana, las cuales fallecieron precisamente en este momento en el que no se pudo ingresar a evaluarlas.

A pesar de las limitaciones, es importante resaltar que, a través de los resultados obtenidos, se logró establecer por primera vez en Guatemala y en El Salvador, un modelo murino de la progresión de la enfermedad en ratones de cepa pura (CD-1). También se observó que la cepa proveniente de Santa Ana es más virulenta que la cepa proveniente de Jutiapa, y a su vez la cepa de Huehuetenango mostró ser una cepa de baja virulencia, sin embargo, es necesaria la vigilancia entomológica periódica, ya que un elevado índice de metaciclogenia puede ser un indicador de una cepa con potencial infectivo, este potencial se puede expresar con la rápida destrucción del hábitat en esta región y el cambio climático.

Este estudio sienta las bases para continuar el estudio sistemático de cepas centroamericanas de *T. cruzi*, en ratones singénicos, lo cual permite sumar a resultados de estudios de genética de poblaciones, morfológicos, y genómicos tanto de los vectores como del parásito; y así poder aproximarnos a una mejor comprensión de la progresión de la enfermedad y la virulencia de las cepas de *T. cruzi*, y así proponer estrategias de control más adecuadas para cada región.

## 10. CONCLUSIONES

- Al analizar la virulencia de la cepa de Santa Ana: a) elevado índice de metaciclogenia, b) elevada carga parasitaria, c) mortalidad 100% de ratones en fase aguda, d) Incremento de tamaño del bazo, e) órganos con presencia de nidos de amastigotes, se determinó que la cepa se manifiesta con mayor virulencia en la fase aguda y por eso es posible hacer una detección temprana de la enfermedad.
- La cepa proveniente de Jutiapa tuvo un comportamiento similar al reportado en la literatura para otras cepas Latinoamericanas, donde los ratones llegan a la fase crónica de la enfermedad con daños en el tejido cardíaco. Por otro lado, la cepa de Huehuetenango mostró una baja virulencia ya que no infectó a los ratones, sin embargo, es necesario que se haga una vigilancia entomológica constante ya que un elevado índice de metaciclogenia puede ser un indicador de una cepa con un alto potencial infectivo, que puede desarrollar mediante la destrucción del hábitat en esta región y el cambio climático.
- Por medio de la progresión de la enfermedad: índice de, metaciclogenia, curvas de parasitemia, características físicas y cortes histológicos, se pudo establecer que la cepa proveniente de Santa Ana es más virulenta que la cepa proveniente de Jutiapa, y a su vez la cepa de Huehuetenango mostró ser una cepa de baja virulencia.

## 11. RECOMENDACIONES

- Realizar cortes histológicos en las dos fases de la infección: aguda y crónica, para detallar el tropismo del parásito en los órganos durante toda la enfermedad.
- Diseñar un experimento similar, incluyendo la nueva especie *T. huehuetenanguensis* para poder plasmar la virulencia de esta nueva cepa.
- Realizar prueba de PCR a cada órgano en ambas fases de la enfermedad como prueba confirmatoria, para determinar en qué órganos estuvo presente el parásito.

## 12. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Alyenmi, D., et. al. (2017) Stroke and brain atrophy in chronic Chagas disease patients: A new theory proposition. *Human Pathology: Case Reports* 7: 23-26.
2. Beard, C (2005). Kissing bugs and bed bugs, the heteroptera. In: Marquardt WC (ed). *Biology of Disease Vector*. Elsevier Academic Press: Amsterdam. pp 57–65
3. Becerril, M., Rangel, E., Imbert, J., Gómez, J. & Figueroa, H. (2007) Human infection and risk of transmission of Chagas disease in Hidalgo state, Mexico. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 76(2), 318-323
4. Becerril, M., Salazar, P., Ramírez, Z. (2008). Analysis of Variability of Clones and Subclones of *Trypanosomacruzi* Derived from Mexican Strains by Behavior in Mice and Culture Cells. *Research Journal of Medical Sciences*, 2(4), 166-174

5. Bern, C., Kjos, S., Yabsley, M. J., & Montgomery, S. P. (2011). *Trypanosoma cruzi* and Chagas' Disease in the United States. *Clinical Microbiology Reviews*, 24(4), 655–681. doi:10.1128/cmr.00005-11
6. Bonney, K. (2014) Chagas disease in the 21st Century: a public health success or an emerging threat? *Parasite* 21(11), doi: 10.1051/parasite/2014012.
7. Castillo, M. (2017). Chagas disease in non-endemic countries Globalization. *The Lancet Global Health* 5(4): 379-380
8. Centers for Disease Control and Prevention -CDC- (2021), Parasites - American Trypanosomiasis (also known as Chagas Disease). Recover from: <https://www.cdc.gov/parasites/chagas/>
9. Chávez, E. (2015). Análisis de Chagas Guatemala. Ministerio de Salud pública y asistencia social Guatemala. Recuperado de: <http://epidemiologia.mspas.gob.gt/files/Publicaciones%202016/Salas%20Situaciones/An%C3%A1lisis%20de%20Chagas%202015>
10. Contreras, V., Morel, C. & Goldenberg, S. (1985). Stage specific gene expression precedes morphological changes during *Trypanosoma cruzi* Metacyclogenesis. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 14, 83-96
11. Cruz, L., et. al. (2014). Comparative study of the biological properties of *Trypanosoma cruzi* I genotypes in a murine experimental model. *Infection, Genetics and Evolution*, 1-8, DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.meegid.2014.11.012>
12. De Alba, M., (2020) Análisis histológico del corazón infectado con *T. cruzi*, cepa de Santa Ana. Comunicación personal. Laboratorio Biología de Parásitos, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de México -UNAM-

13. De Alba-Alvarado, et.al. (2020) Response to Infection by *Trypanosoma cruzi* in a Murine Model. *Frontiers in Veterinary Science* 7: 1-11. Doi: <https://doi.org/10.3389/fvets.2020.568745>
14. De Meis, J., Morrot, A., Farias, D., Serra, D. & Savino, W. (2009) Differential Regional Immune Response in Chagas Disease. *Plos Neglected Tropical Diseases* 3(7):e417. doi: 10.1371/journal.pntd.0000417
15. Demetrius, L. (2006). Aging in Mouse and Human Systems a Comparative Study. *Annals of the New York Academy of Science*, 1067, 66-82 doi: 10.1196/annals.1354.010
16. Dorn, P., McClure, A., Gallaspy, M., Waleckx, A., Monroy, C. & Stevens, L. (2017). The diversity of the Chagas parasite, *Trypanosoma cruzi*, infecting the main Central American vector, *Triatoma dimidiata*, from Mexico to Colombia. *Plos Neglected Tropical Diseases*, 11(9), 1-5
17. Espinoza, B., Rico, T., Sosa, S., Oaxaca, E., Vizcaino, A., Caballero, M. & Martínez, I. (2010). Mexican *Trypanosoma cruzi* *T. cruzi* I strain with different degrees of virulence induce diverse humoral and cellular immune responses in a murine experimental infection model. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2010, 1-10 doi:10.1155/2010/890672
18. García, F. (2007). Diagnostico socioeconómico, potencialidades productivas y propuestas de inversión. Universidad de san Carlos de Guatemala. Ejercicio de prácticas Supervisadas.
19. Gascon, J., Bern, C. & Pinazo, M. (2010). Chagas disease in Spain, the United States, and other non-endemic countries. *Acta tropica* 115: 22-27



20. Gourbiere, S., Dorn, P., Tripet, F. & Dumonteil, E. (2012). Genetics and evolution of triatomines: from phylogeny to vector control. *Heredity* 108: 190-202  
doi:10.1038/hdy.2011.71
21. Guhl, F., (2009). Enfermedad de Chagas: Realidad y perspectivas. *Revista Biomedica* 20, 228–234.
22. Hashimoto & Schofield (2012). Elimination of *Rhodnius prolixus* in Central America. *Parasites & Vectors* 5(45): 1-10
23. Hernández, J., Monroy, C. & Mejía, M. (1996) Relación entre el grado de parasitemia de dos cepas guatemaltecas de *Trypanosoma cruzi* y el tropismo tisular. Tesis de Licenciatura
24. Hotez, P. J., Woc-Colburn, L., & Bottazzi, M. E. (2014). Neglected tropical diseases in Central America and Panama: Review of their prevalence, populations at risk and impact on regional development. *International Journal for Parasitology*, 44(9), 597–603. doi:10.1016/j.ijpara.2014.04.001
25. Hypsa, V., Tietz, D., Zravy, J., Rego, R., Galvao, C. & Jurberg, J. (2002). Phylogeny and biogeography of Triatominae (Hemiptera: Reduviidae): molecular evidence of a New World origin of the Asiatic clade. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 23: 447–457
26. IPCA (2012). XIV Reunión de la Comisión Intergubernamental de la Iniciativa de los Países de Centroamérica (IPCA). para la Interrupción de la Transmisión Vectorial, Trnsfusional y Atención Médica de la Enfermedad de Chagas
27. Jurberg, J. & Galvao, C. (2006). Biology, ecology, and systematics of Triatominae (Heteroptera, Reduviidae), vectors of Chagas disease, and implications for human health. *Landesmuseen Neue Serie* 50: 1096-1116

28. Laranja, F., Dias, M., Nobriega, M. & Miranda, M. (1956). Chagas' Disease: A Clinical, Epidemiologic, and Pathologic Study. *Circulation* 14: 1035-1060
29. Lee, B., Bacon, K., Bottazzi, M., Hotez, P. (2013). Global economic burden of Chagas disease: a computational simulation model. *The Lancet Infectious Diseases* 13(4):342-348. doi:10.1016/S1473-3099(13)70002-1
30. Lent, H. & Wygodzinsky, P. (1979). Revision of the Triatiminae (Hemiptera, Reduviidae), and their significance as vectors of Chagas' disease. *Bulletin of the American Museum of Natural History* 163: 520 pp.
31. León, C., Montilla, M., Vanegas, R., Castillo, M., Parra, E. & Ramírez, J. (2016). Murine models' susceptibility to distinct *Trypanosoma cruzi* I genotypes infection. *Parasitology*; 1-8 doi: 10.1017/S0031182016001980
32. Lima, R., Monroy, C., Stevens, L., Rodas, A. Rodas, G., Dorn, P. & Justi, S. (2019). Description of *Triatoma huehuetenanguensis* sp. n., a potential Chagas disease vector (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). *ZooKeys*, (820), 51–70. <https://doi.org/10.3897/zookeys.820.27258>
33. Llop, A., Valdés, M. & Zuazo, J. (2001). *Microbiología y Parasitología Médicas Tomo III*. Cuba: Editorial de Ciencias Médicas
34. Lucero, D., Morrissey, L., Rizzo, D., Rodas, A., Garnica, R., Stevens, L., et. al (2013). Ecohealth Interventions Limit Triatomine Reinfestation following Insecticide Spraying in La Brea, Guatemala. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 88(4), 630-637

35. Martín-Escolano, R., Cebrián, R., Maqueda, M., Romero, D., Rosales, M., Sánchez, M. & Marín, C. (2020) Assessing the effectiveness of AS-48 in experimental mice models of Chagas' disease. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 75(6):1537-1545.
36. Melquiades, C., et Al. (2010). Coinfection with Different *Trypanosoma cruzi* Strains Interferes with the Host Immune Response to Infection. *Neglected Tropical Disease* 4(10): 1-15
37. Ministerio de Asuntos Exteriores y de Cooperación (2016). Ficha País El Salvador. Ministerio de Asuntos Exteriores y de Cooperación. España. 14pp.
38. Ministerio de Asuntos Exteriores y de Cooperación (2016). Ficha País Guatemala. Ministerio de Asuntos Exteriores y de Cooperación. España. 14pp
39. Ministerio de Economía de Guatemala (2015). Departamento de Jutiapa. Revisado el 23 de febrero de 2018 en: <https://dae.mineco.gob.gt/mapainteractivo/index.php?controller=crm&action=detalles&id=>
40. Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social (2012) Manual operativo de vigilancia y control entomológico de la enfermedad de Chagas. Guatemala. 45pp.
41. Monroy, C., Bustamante, D., Pineda, S., Rodas, A., Castro, X., Ayala, V., et. al (2009). House improvements and community participation in the control of *Triatoma dimidiata* re-infestation in Jutiapa, Guatemala. *Cadernos de Saúde Pública* 25(1), 168-178
42. Monroy, C., Rodas, A. (2019) Distribución de *T. dimidiata* en el territorio guatemalteco. Comunicación oral. Universidad de San Carlos de Guatemala.

43. Nakagawa J, Cordon-Rosales C, Juarez J, Itzep C, Nonami (2003). T. Impact of residual spraying on *Rhodnius prolixus* and *Triatoma dimidiata* in the Department of Zacapa in Guatemala. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 98:277-81.
44. Nakagawa J, Hashimoto K, Cordon-Rosales C, Juarez JA, Trampe A, Marroquin L. (2003). The impact of vector control on *Triatoma dimidiata* in the Guatemalan department of Jutiapa. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology* 97:289-98.
45. Nguyen, D. & Xu, T. (2008). The expanding role of mouse genetics for understanding human biology and disease. *Disease Models & Mechanisms* 1: 56-66 doi: 10.1242/dmm.00232
46. Organización Mundial de la Salud (OMS). (2016). Enfermedades transmitidas por vectores. Recuperado de: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs387/es/>
47. Organización Mundial de la Salud (OMS). (2020). Chagas disease (also known as American trypanosomiasis). Recuperado de: [https://www.who.int/news-room/factsheets/detail/chagas-disease-\(american-trypanosomiasis\)](https://www.who.int/news-room/factsheets/detail/chagas-disease-(american-trypanosomiasis))
48. Organización Panamericana de la Salud (OPS) (2010). La enfermedad de Chagas en El Salvador, evolución histórica y desafíos para el control. Organización Panamericana de la Salud. Recuperado de: [https://iris.paho.org/bitstream/handle/10665.2/54737/9789992340837\\_spa.pdf?sequence=1&isAllowed=y](https://iris.paho.org/bitstream/handle/10665.2/54737/9789992340837_spa.pdf?sequence=1&isAllowed=y)
49. Osorio, L, Ríos, I., Gutiérrez, B. & González, J. (2012) Virulence factors of *Trypanosoma cruzi*: who is who? *Microbes and Infection* 14(15):1390-402. doi: 10.1016/j.micinf.2012.09.003.

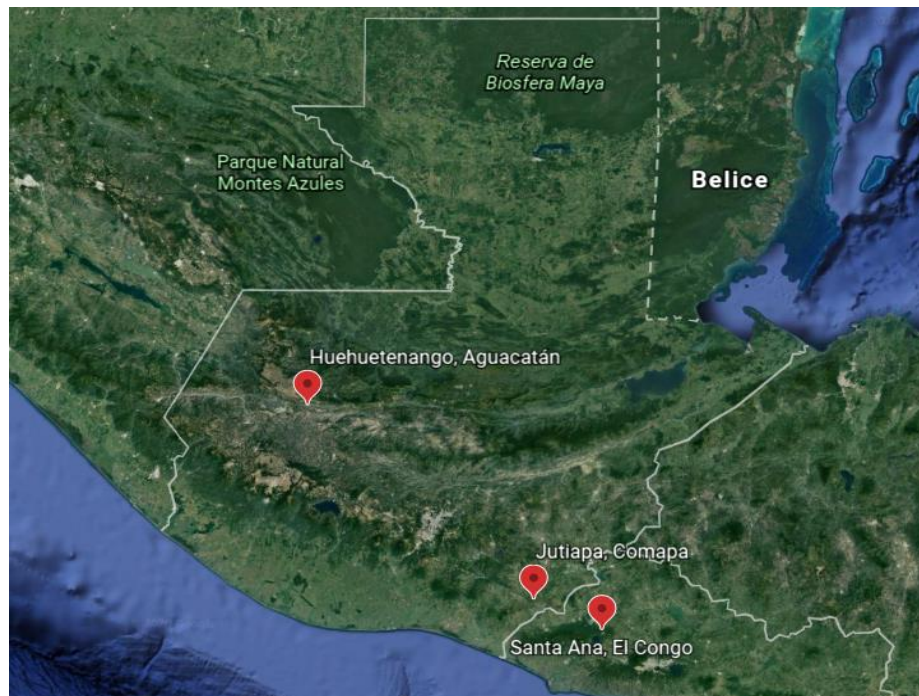
50. Prata, A. (2001). Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease. *Infectious diseases 1*: 92-100
51. Perreira, M., Donnes, W., Morillo, C., Encina, J. & Ribeiro, A. (2013) Chagas Disease: An Overview of Clinical and Epidemiological Aspects. *Journal of the American College of Cardiology* 62(9): 767-776
52. Peterson, J., Hashimoto, K., Yoshioka, K. et al. (2019) Chagas Disease in Central America: Recent Findings and Current Challenges in Vector Ecology and Control. *Current Tropical Medicine Reports* 6: 76–91. <https://doi.org/10.1007/s40475-019-00175-0>
53. Queen, J, Quinn, G., & Keough, M. (2002) Experimental Design and Data Analysis for Biologists. Cambridge University Press. United Kingdom.
54. Rassi, A., Rassi, A & Marin-Neto, J. (2010). Chagas disease. *Lancet* 375: 1388-1402
55. Rimoldi, A., Tomé, R., Ambrósio, D., Tita, M., Martinez, I. Freitas, R., Barreto, R. & Aristeu, J. (2012). Morphological, biological and molecular characterization of three strains of *Trypanosomacruzi*Chagas, 1909 (Kinetoplastida, Trypanosomatidae). isolated from *Triatomasordida*(Stal). 1859 (Hemiptera, Reduviidae). and a domestic cat. *Parasitology* 139: 37-44 doi:10.1017/S0031182011001697
56. Rodas, A. (1997) Caracterización biológica de cinco cepas guatemaltecas de *Trypanosoma cruzi* aislados de *Triatoma dimidiata* y *Triatoma nítida* (tesis de licenciatura).
57. Rodriguez, A., et. al. (2012) IFN- $\gamma$  Plays a Unique Role in Protection against Low Virulent *Trypanosoma cruzi* Strain. *Neglected Tropical Diseases* 6(4). doi: 10.1371/journal.pntd.0001598.

58. Sasawaga, et al. (2014) Acute Chagas disease in El Salvador 2000-2012- Need for surveillance and control. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 109(2): 256-258.
59. Salazar, P., Haro, I. & Cabrera, M. (2005). Tres especies de triatomíneos y su importancia como vectores de *Trypanosoma cruzi* en México. *MEDICINA* 65(1): 63-69
60. Salazar-Schettino, P., et. al. (2010) Revisión de 13 especies de la familia Triatominae (Hemiptera: Reduviidae) vectores de la enfermedad de Chagas, en México. *Journal of the Selva Andina Research Society* 1(1): 57-80
61. Samuel, J., Oliveira, M. Correa, Araujo, R., Navarro, M. & Muccillo, G. (1983) Cardiac thrombosis and thromboembolism in chronic Chagas' heart disease. *The American Journal of Cardiology* 52(1): 147-151. doi: 10.1016/0002-9149(83)90085-1
62. Samuels, M. & Clark, E., et. al., (2013) Epidemiology of and Impact of Insecticide Spraying on Chagas Disease in Communities in the Bolivian Chaco. *Plos Neglected Tropical Diseases* 7(8): e2358. doi:10.1371/journal.pntd.0002358.
63. Schofield CJ 1994. Triatominae: Biología y Control. Eurocommunica Publications, W Sussex, 80 pp.
64. Schofield, P., Hoehndorf, R. & Gkoutos, G. (2012). Mouse genetic and phenotypic resources for human genetics. *Human Mutation* 33(5): 826-836. doi: 10.1002/humu.22077

65. Solórzano, E. (2015) Estructuración Genética del parásito *Trypanosomacruzi* en su hospedero *Triatoma dimidiata* en zonas geográficas con tasas de infección contrastantes. Universidad Austral de Chile. Tesis de Magister no publicada.
66. Steverding, D. (2014) The history of Chagas disease. *Parasites Vectors* 7(317): 2-8. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-7-317>
67. Tyler, K. & Engman, D. (2001). The life cycle of *Trypanosoma cruzi* revisited. *International Journal of Parasitology* 31: 472-481
68. Villalta, F & Girish, R. (2019) Advances in preclinical approaches to Chagas disease drug discovery, *Expert Opinion on Drug Discovery*, 14:11, 1161-1174, DOI: 10.1080/1

### 13.ANEXOS

**Anexo 1.** Puntos de muestreos de *T. dimidiata* en Guatemala: Jutiapa (Comapa) y Huehuetenango (Aguacatán) y en El Salvador: Santa Ana (El Congo). Fuente: Google Earth.



## Anexo 2. Carta autorización de protocolo animal en el Bioterio "Amarillis Saravia" en la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia -USAC-



COMITÉ INSTITUCIONAL PARA EL CUIDADO Y USO  
DE LOS ANIMALES DE LABORATORIO (CICUAL)



Guatemala, 17 de agosto de 2018

**Nombre del Investigador:** Andrea Judith Pérez Morales  
**Institución:** USAC- Facultad de Farmacia  
**Correo electrónico:** andreajpmo@gmail.com  
**Teléfono:** (502) 4113 5051

Estimado investigador:

Por este medio se hace constar que el proyecto de investigación titulado: "Evaluación de la virulencia de cuatro cepas de Trypanosoma cruzi provenientes de localidades endémicas para la Enfermedad de Chagas en Guatemala y El Salvador" ha sido revisado por miembros del comité institucional para el cuidado y uso de los animales de laboratorio (CICUAL) de la universidad de San Carlos de Guatemala.

Las evaluaciones hechas al proyecto son con fines de asegurar el trato ético y adecuado de los animales que serán utilizados para el cumplimiento de los requisitos de la investigación.

Se ha determinado que se cumple con los requisitos necesarios para el uso de animales y se han seguido las recomendaciones dadas por el comité, por tal motivo se autoriza la practica con animales en el tiempo establecido en el protocolo de investigación.

Sin otro particular, me suscribo

Universidad de San Carlos de Guatemala



Dr. Cristian González  
Médico Veterinario  
Secretario CICUAL  
Bioterio Facultad de Farmacia

Página 1 de 1

Ve cibido

24/08/18

Andrea



### Anexo 3. Tabla de observaciones del número de parásitos de cada localidad

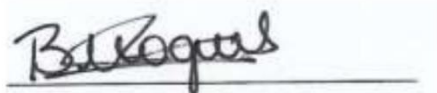
	Santa Ana				Jutiapa			
	Hembra 1	Hembra 2	Macho 1	Macho 1	Hembra 1	Hembra 2	Macho 1	Macho 2
día 1	0	0	0	0	0	0	0	0
3	0	0	0	0	0	0	0	0
6	0	0	0	0	0	0	0	0
9	0	5000	5000	5000	0	0	0	0
12	25000	50000	35000	40000	20000	5000	5000	10000
15	140000	105000	220000	140000	75000	20000	70000	65000
18	300000	210000	525000	180000	155000	55000	275000	145000
21	565000	545000	2350000	925000	110000	155000	370000	260000
24	480000	620000			215000	165000	505000	420000
27					115000	130000	695000	225000
30					5000	15000	515000	225000
33					0	5000	165000	40000
36					0	5000	5000	15000
39					0	5000	5000	15000
42					0	5000	5000	5000
45					0	0	0	0
48					0	5000	0	0
51					5000	0	0	0
54					0	0	0	0
57					0	0	0	0
60					0	0	0	0
63					0	0	0	0
66					0	0	0	0
69					0	0	0	0

En amarillo se muestran los datos del día de máxima parasitemia



Andrea Judith Perez Morales

Tesista



Bárbara Beatriz Moguel Rodríguez, PhD.

Asesor




M.Sc. Elizabeth Solórzano Ortiz

Asesor



Licda. Antonieta Guadalupe Rodas Retana

Revisor



Sergio Alejandro Melga Valladares, PhD.

Director



M.A. Pablo Ernesto Oliva Soto

Decano