

**Evaluación cuantitativa e histológica de la
transmisión materno-fetal de *Trypanosoma cruzi*
(DTU I) en *Cavia porcellus*: un modelo experimental
de la enfermedad de Chagas congénita**

TESIS

**PRESENTADA COMO REQUISITO PARA OBTENER EL
GRADO DE**

MAESTRO EN CIENCIAS AGROPECUARIAS

POR:

**Médico Veterinario Zootecnista
Jatziri Torres Vargas**

**Directores:
Dra. Matilde Jiménez Coello
Dra. Eugenia Guzmán Marín
Dr. Antonio Ortega Pacheco**



Mérida, Yuc., febrero 01, 2017

POSGRADO INSTITUCIONAL
CIENCIAS AGROPECUARIAS Y MANEJO
DE RECURSOS NATURALES TROPICALES



UADY

POSGRADO
INSTITUCIONAL
EN CIENCIAS
AGROPECUARIAS Y
MANEJO DE RECURSOS
NATURALES TROPICALES

**ALUMNO: MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA
JATZRI TORRES VARGAS**

SINODO DEL EXAMEN DE TESIS DE GRADO

DRA KARLA Y. ACOSTA VIANA

CIR-HIDEYO NOGUCHI

DR. ROGER IVÁN RODRÍGUEZ VIVAS

CCBA-UADY

DR. CARLOS ACEVEDO ARCIQUE

CCBA-UADY

DR. HUGO RUIZ PIÑA

CIR-HIDEYP NOGUCHI

DR. RICARDO AKÉ LÓPEZ

CCBA-UADY

MÉRIDA, YUCATÁN, MARZO, 2018

AGRADECIMIENTOS

Al consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada para la realización de mis estudios de Maestría en Ciencias Agropecuarias.

A mis asesores la Dra. Matilde Jiménez Coello, la Dra. Eugenia Guzmán Marín y el Dr. Antonio Ortega Pacheco, por su apoyo y amistad durante mi formación.

A todo el equipo del laboratorio de Biología Celular, personas a las cuales les gusta compartir sus conocimientos y su apoyo incondicional durante mi estancia en el laboratorio muchas gracias, Ivonne, Abril, Víctor, Glendy, Antonio, Hernán, Karlita y la Q.F.B. Maru.

Un especial agradecimiento a la Unidad de Enseñanza Médica del Campus de Ciencias Biológicas y Agropecuarias (UEM-CCBA) a la MVZ Eva Rosado, al Dr. Eduardo Gutiérrez por su apoyo y colaboración durante el periodo de toma de muestras. Así como, a la Unidad de Diagnóstico del CCBA por su apoyo en el resguardo y procesamiento de muestras.

A todos mis colegas y amigos que durante este tiempo ayudaron de alguna forma al desarrollo de este trabajo, que estuvieron siempre a mi lado y que sin ellos no pudiera haberse hecho realidad esto: Bricia, Manuel, Noé, Carlos, Jorge, Dianely, Sayri y todo el equipo del Hospital Veterinario El Arca de Noé.

A mi familia por ser mi fortaleza en los momentos más difíciles. Mis padres (Maru y Vicente) mi hermano (Jonatán) y mi esposo Héctor por alentarme a estudiar y tener este gusto compartido por la ciencia y los animales.

DECLARATORIA

“El presente trabajo no ha sido aceptado o empleado para el otorgamiento de título o grado diferente o adicional al actual. La tesis es resultado de las investigaciones del autor, excepto donde se indican las fuentes de información consultadas. El autor otorga su consentimiento a la UADY para la reproducción del documento con el fin del intercambio bibliotecario siempre y cuando se indique la fuente”.

RESUMEN

La transmisión congénita de *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*) es considerada un tema relevante en diversos países Latinoamericanos, debido a que son múltiples los factores que pueden favorecer la transmisión del parásito hacia los neonatos, destacando entre ellos, la variabilidad genética del parásito y la prevalencia de dicha enfermedad congénita en las áreas geográficas. *T. cruzi* puede llegar al feto a través de la placenta, lo que incrementa el riesgo que los productos adquieran la infección, la cual puede ocurrir en cualquier etapa de la gestación, pero con variaciones importantes dependiendo de la fase de la enfermedad y del período de gestación. En México, se ha descrito que uno de los genotipos de *T. cruzi* de mayor presencia tanto en humanos, como en reservorios es el DTU I, mismo que se asocia con la presencia de cardiopatías en casos clínicos, sin embargo, se desconoce el impacto sobre el feto cuando la infección se origina antes o durante la gestación. De acuerdo con lo ya expuesto, el objetivo de este trabajo fue evaluar la transmisión congénita de *T. cruzi* (DTU I) en un modelo de cobayos (*Cavia porcellus*) infectados experimentalmente antes (IAG) y durante la gestación (IDG). La infección de las madres y crías fue evaluada mediante detección del DNA del parásito en sangre, así como por la evaluación inmunológica (anticuerpos IgG) e histopatológica en muestras de las madres y fetos. Se detectó la presencia de anticuerpos contra *T. cruzi*-por ELISA y Western Blot (WB) de las hembras IDG e IAG y presentaron una carga parasitaria en sangre de 1.62 ± 2.2 y 50.1 ± 62 parásitos/ μ l, respectivamente, mediante PCR cuantitativa (PCRc). La evaluación histológica demostró degeneración de fibras musculares y necrosis celular en todas las crías infectadas. No se detectaron nidos de parásitos; sin embargo, la PCRc detectó $153 \pm 104,7$ y $169,3 \pm 129,4$ parásitos-eq / g en el corazón de las crías IAG e IDG, respectivamente. Todos los fetos de las hembras infectadas fueron seropositivos y se identificó DNA de *T. cruzi* en los tejidos evaluados (corazón, músculo esquelético y placenta), pero presentaron bajo nivel de infiltrado inflamatorio. Fetos del grupo IDG (vs IAG) tuvieron mayor grado de degeneración de fibra muscular y necrosis celular en el corazón y el tejido esquelético. El tejido placentario no presentó lesiones inflamatorias o nidos amastigotes, sin embargo, se detectaron $381,2 \pm 34,3$ y $79,2 \pm 84,9$ parásitos-eq / g en las placentas IDG e IAG, respectivamente. El desarrollo fetal se vio comprometido y se evidenció por una disminución en el peso, longitud de la cría y ancho abdominal en ambos grupos infectados. Se ha demostrado que *Cavia porcellus* puede ser un modelo de estudio para la infección por *T. cruzi* y transmisión materno-fetal. La frecuencia de transmisión a los fetos fue alta, independientemente de si la madre estuvo expuesta a la infección antes o durante la gestación.

Palabras clave: Transmisión congénita, *T. cruzi*, PCRc, DTU I.

SUMMARY

The congenital transmission of *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*) is considered a relevant issue in several Latin American countries. There are multiple factors that may favor the transmission of the parasite to the infected infants. Between them, the prevalence of the disease in the different geographic areas, as well as the genetic variability of the parasite. *T. cruzi* can reach the fetus through the placenta, which increases the risk that the products acquire the infection at any stage of gestation, but with important variations depending on the phase of the disease and the gestation period. In Mexico it has been described that one of the most circulating genotypes, in both human and reservoirs, is the *T. cruzi* DTUI, which is associated with the presence of cardiopathies in clinical cases. However, the rate of congenital transmission or the impact on the products when the infection occurs before or during gestation. Therefore, the objective of this work was to evaluate the congenital transmission of *T. cruzi* (DTU I) in a *Cavia porcellus* model experimentally infected before (IBG) and during gestation (IDG). Infection of mothers and offspring was evaluated by detection of parasite DNA, as well as by immunological (IgG antibody) and histopathological evaluation in samples from mothers and fetuses. A presence of antibodies for *T. cruzi* was detected by ELISA and Western Blot (WB) of the IDG and IAG females and had a parasite blood load of 1.62 ± 2.2 and 50.1 ± 62 parasites / μl , respectively, by quantitative PCR. Histological evaluation demonstrated degeneration of muscle fibers and cellular necrosis in all infected females. No parasite nests were detected; however, qPCR detected 153 ± 104.7 and 169.3 ± 129.4 parasites-eq / g in the heart of the IBG and IDG groups respectively. All fetuses of the infected females were seropositive and *T. cruzi* DNA was identified in the tissues (heart, skeletal muscle and placenta), but presented at a low level of inflammatory infiltrate. Fetuses of IDG (vs. IBG) had a higher degree of muscle fiber degeneration and cellular necrosis in the heart and skeletal tissues. The placental tissue had no inflammatory lesions or amastigote nests; however, 381.2 ± 34.3 and 79.2 ± 84.9 parasites-eq / g were detected in placentas IDG and IAG, respectively. Fetal development was compromised and was evidenced by a decrease in weight, breeding length and abdominal width in both infected groups. It has been shown that *Cavia porcellus* can be a study model for *T. cruzi* infection and maternal-fetal transmission. The frequency of transmission to the fetuses was high, regardless of whether the mother was exposed to the infection before or during pregnancy.

Key words: Congenital transmission, *T. cruzi*, qPCR, DTU I.

ÍNDICE GENERAL

I.	INTRODUCCIÓN.....	1
II.	MARCO TEÓRICO.....	3
2.1	Generalidades de la Enfermedad de Chagas.....	3
2.2	Distribución geográfica de la Enfermedad de Chagas	4
2.3	Enfermedad de Chagas en México	7
2.4	Agente causal	8
2.4.1	Variación genética de <i>Trypanosoma cruzi</i>	9
2.4.2	Vector biológico	13
2.4.3	Ciclos de transmisión.....	14
2.5	Diagnóstico de la enfermedad de Chagas.....	15
2.6	Vías de transmisión	17
2.7	Transmisión congénita de <i>T. cruzi</i>	17
2.8	La placenta y la Enfermedad de Chagas en la gestación	19
2.9	Modelos animales empleados en la transmisión congénita de la Enfermedad de Chagas	22
2.9.1.	<i>Cavia porcellus</i> como modelo experimental en la Enfermedad de Chagas Congénita.....	24
III.	OBJETIVO GENERAL.....	25
3.1	Objetivos específicos.....	25
	ARTÍCULO (ORIGINAL RESEARCH) ELABORADO DE ACUERDO AL FORMATO DE LA REVISTA PLOS Neglected Tropical Diseases	37
V.	CONCLUSIÓN GENERAL	62
VI.	ANEXOS	63
	Anexo 1. Protocolo de anestesia-eutanasia.....	63
	Anexo 2. Formato del Reporte para el registro de necropsias.....	64
	Anexo 3. Hoja de monitoreo	64

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura A. Posibles rutas de transmisión materno-fetal de <i>Trypanosoma cruzi</i>	22
Figura 1. Análisis serológico y parasitológico de las hembras de <i>Cavia porcellus</i> infectadas con <i>Trypanosoma cruzi</i>	55
Figura 2. Medidas morfométricas de las crías IDG IAG y control negativo.....	56
Figura 3. Análisis serológico y parasitológico de crías de hembras infectadas con <i>T. cruzi</i>	58
Figura 4. Evaluación histológica de tejidos de crías <i>Cavia porcellus</i>	59
Figura 5. Evaluación histológica de tejido cardiaco de hembras <i>Cavia porcellus</i>	60

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.- Severidad y frecuencia de las lesiones presentes en órganos de crías de <i>Cavia porcellus</i> infectadas con <i>T. cruzi</i>	70
-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

I. INTRODUCCIÓN

La Tripanosomiasis Americana o Enfermedad de Chagas (EC), es causada por el protozoo flagelado *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*). Éste, circula en gran diversidad de mamíferos, desde aquellos silvestres, tales como marsupiales, desdentados, así como primates y roedores caviomorfos, por mencionar algunos (OMS, 2015). Existen varias formas de transmisión de la infección con *T. cruzi*, siendo la vía vectorial la principal en zonas endémicas. Este parásito se transmite a los seres humanos, principalmente por las heces de insectos triatómicos hematófagos infectados que son conocidos en México como chinches (Solórzano-Santos, 2008). Existen 30 especies de triatóminos presentes en México (sin considerar las subespecies), distribuidos entre siete géneros: *Belminus*, *Dipetalogaster*, *Eratyrus*, *Paratriatoma*, *Panstrongylus*, *Rhodnius* y *Triatoma*. Con base en sus hábitos domiciliarios y la propensión a defecar inmediatamente después de alimentarse de la sangre, nueve de estas especies han sido consideradas como vectores importantes de *T. cruzi* (Cruz-Reyes y Pickering, 2006). En Yucatán se le conoce como “pic” (en lengua maya) y al cual se le atribuye ser el principal transmisor del parásito en la región.

Por otro lado, la EC, si es detectada durante la fase aguda, puede tratarse con parasiticidas como el Benznidazol, o el Nifurtimox. Se señala que ambos medicamentos son eficaces entre un 64% a 84% (Andrade *et al.*, 2004) para curar la enfermedad, si se administran al comienzo de la infección. La vía oral es la ruta de elección para la administración del tratamiento etiológico de la EC. Es la vía de administración más sencilla, segura, económica y de mayor aceptación por parte de los pacientes. Sin embargo, los efectos adversos que dichos fármacos ocasionan conllevan a no finalizar apropiadamente el tratamiento, por lo cual no permiten tener un resultado certero (OMS, 2015)

La infección también se puede adquirir mediante transfusión de sangre contaminada, por vía congénita (de la madre infectada a su hijo) (Cardoso *et al.*, 2012) y mediante órganos donados, aunque esta última es una forma de transmisión menos frecuente (Luquetti *et al.*, 2015) pero no poco probable, por lo

que es necesario un tamizaje de los donadores que tengan factores de riesgo demográficos, como lo son los países de Latinoamérica que son considerados países endémicos (Kun et al., 2009).

La transmisión congénita (TC) de *T. cruzi* es muy importante y diversos factores pueden influir sobre la misma, entre los que destacan: el área geográfica y la variabilidad genética del parásito (Blanco et al., 2000; Prata, 2001; Cardoso et al., 2012). Algunos autores describen que la TC puede ocurrir en cualquier momento de la gestación (Guzmán-Bracho et al., 1998; Gamboa-León et al., 2011; Carlier, 2015), sin embargo, otros autores describen que es más probable que la infección pueda ocurrir durante el tercer trimestre de la gestación en humanos (Carlier y Torrico, 2003). Este hecho probablemente ocurre debido a la invasión de la placenta por tripomastigotes, lo que podría resultar favorable después de la semana 20 de gestación ya que, es a partir de este período donde la placenta sufre una serie de transformaciones fisiológicas y metabólicas que facilitan la invasión de patógenos (Desai et al., 2007).

México se considera un área endémica de la EC, debido a que las características geográficas del país favorecen la presencia abundante de vectores y reservorios infectados con el parásito, reportándose casos en Oaxaca, Chiapas, Yucatán, Jalisco, Michoacán, Guerrero, Veracruz, por mencionar algunos estados (Cruz-Reyes y Pickering-López, 2006; Cardoso et al., 2012; Jimenez-Cardoso et al., 2013). El estudio de la TC, como vía de transmisión en México es modesto, sólo se ha reportado un caso de enfermedad congénita de *T. cruzi* (Guzmán-Bracho et al., 1998), mientras que la prevalencia de la infección por *T. cruzi* en mujeres embarazadas se ha estimado en un 5% en Chiapas, 3.5% en Veracruz, 0.6% en Yucatán y el 0.4% en Guanajuato (Olivera-Mar et al., 2006; Gamboa-León et al., 2011).

Se menciona que la mayor parte de los casos se observan en zonas rurales y con condiciones socioeconómicas precarias (OMS, 2002). Los parásitos pueden llegar al feto vía hematogena, a través de la placenta (Bittencourt, 1976; Andrade, 1982; Nisida, 1999; Carlier, 2005). Sin embargo, se desconoce realmente la magnitud

del problema en las regiones endémicas, sobre todo donde no existe control del vector.

II. MARCO TEÓRICO

2.1 Generalidades de la Enfermedad de Chagas

El protozooario *T. cruzi*, infecta a una gran diversidad de hospederos mamíferos incluyendo a los seres humanos, la principal vía de transmisión es la vectorial (Solórzano-Santos, 2008). Sin embargo, también puede transmitirse mediante transfusión de sangre, a través de la placenta (congénita), por la donación de órganos, y a través de la ingesta de alimentos contaminados, aunque esta última es una forma menos frecuente (Figueroa, 1998; Dumonteil, 1999; Sosa-Estani *et al.*, 2009; Kemmerling *et al.*, 2010; Toso *et al.*, 2011; Carlier, 2015). La infección por *T. cruzi* se conoce también como Enfermedad de Chagas, en honor al nombre de Carlos Ribeiro Justiniano Chagas, quien fue un médico brasileño que describió formalmente la enfermedad a principios del siglo XX (Chagas, 1909). En humanos se reconocen tres etapas clínicas principales: la fase aguda, que aparece poco después de la infección, y puede extenderse hasta por cuatro meses; se caracteriza por alta parasitemia y respuesta inflamatoria de intensidad variable. (Dumonteil, 1999; Rosa *et al.*, 2001; Moya *et al.*, 2005). Esto debido a que se presenta una multiplicación y destrucción de macrófagos tisulares de forma cíclica, de manera que la carga parasitaria se incrementa antes de diseminarse al resto del organismo. (Barr, 2000; Carbajosa González, 2014).

Cuando la infección se adquiere a través de la vía vectorial, puede observarse una lesión inicial conocida como chagoma cutáneo o de inoculación, que ocurre en el sitio de la exposición a las heces de insectos triatomíneos que transmiten la infección. Si la inoculación se realiza cerca del ojo o en el área ocular, esta dará origen a una conjuntivitis bupalpebral unilateral, indolora o con ligera molestia, conocido como signo de Romaña (Salazar-Schettino *et al.*, 2011). Los chagomas pueden presentarse en cualquier parte de la piel, con aspecto furúnculoideo y de

color rosado violáceo e indurados; tienen una duración variable, la que puede extenderse hasta 15 días (Apt *et al.*, 2008). Se describe que, en la etapa aguda las manifestaciones clínicas agudas suelen ocurrir en el 10% de los pacientes y el 90% suele evolucionar al estado crónico sin presentar manifestaciones clínicas (OPS, 2004). La fase aguda, es secundada por una etapa intermedia asintomática (también denominada fase indeterminada) que puede variar de 5 a 40 años después de la infección, esta etapa puede pasar desapercibida o con signos leves como fiebre, dolor de cabeza y malestar en general. En este período de tiempo, el sistema inmunológico puede ser capaz de disminuir el número de tripanosomas que circulan en sangre, por debajo de los niveles microscópicamente detectables. Sin embargo, alrededor del 30% al 40% de los individuos pueden desarrollar la enfermedad sintomática a lo largo del tiempo. Actualmente, el uso de biomarcadores para seguir la evolución de cada paciente está siendo evaluada y estandarizada, ya que varios estudios han considerado a la inflamación miocárdica en la patología del paciente chagásico como un aspecto importante a considerar, así como, la evidencia de los parásitos infecciosos después de la infección aguda (Viotti *et al.*, 2017). Y finalmente la fase crónica; la cual se desarrolla aproximadamente en el 30-40 % de los pacientes infectados, (Kirchhoff, 2006) Mismos que desarrollan cardiomiopatía y es la principal causa de mortalidad por enfermedad de Chagas crónica (OPS, 2004); entre el 50 y 80% de los pacientes con esta afección muere después de tres a 5 años (Moncayo *et al.*, 2009; OMS, 2013). Aunque el órgano usualmente más afectado es el corazón (miocarditis), también pueden encontrarse lesiones en intestino y tejido nervioso en menor medida (Parada *et al.*, 1997; Rosa *et al.*, 2001).

2.2 Distribución geográfica de la Enfermedad de Chagas

Se considera que la deforestación, el mal manejo en agricultura y ganadería son algunos de los factores que favorecen los brotes de enfermedades en seres humanos, ya que dichas actividades transforman sustancialmente los ecosistemas y con ello modifican también la dinámica de patógenos, reservorios y

vectores (Cabello y Cabello, 2008). *T. cruzi* se ha destacado por demostrar como la modificación de los procesos ecológicos naturales puede poner en riesgo a las poblaciones para contraer dicha enfermedad, ya que para que se dé el ciclo de transmisión de la misma, se requiere del vector, y en algunos casos los reservorios naturales infectados conviven con las poblaciones humanas (López-Cancino *et al.*, 2015).

La EC, se encuentra distribuida en Latinoamérica, desde el sur de los Estados Unidos de Norteamérica (Shender *et al.*, 2016) hasta Argentina y Chile. Esta enfermedad, ocupa el cuarto lugar de importancia como causa de discapacidad, solo después de las enfermedades respiratorias y el SIDA (Sanmartino *et al.*, 2000; Herrera *et al.*, 2007).

Aunque se ha descrito históricamente que la EC se encuentra principalmente en Latinoamérica, actualmente se tienen reportes tanto de la presencia de vectores como de reservorios selváticos y personas infectadas en los Estados Unidos de América y Canadá. Además, en muchos países europeos y algunos del Pacífico Occidental se han registrado casos de EC, debido en gran medida a la movilidad de la población entre el continente americano y el resto del mundo (OMS, 2016).

La EC, es un problema de salud pública de importancia epidemiológica en Latinoamérica, en donde año con año se tiene un considerable incremento en el número de casos reportados a las instituciones de salud pública de cada entidad. Datos de la OMS (2016) destacan que, en el mundo hay entre 6 y 7 millones de personas infectadas, la mayoría de ellas en Latinoamérica, donde la EC es endémica. Desde la década pasada se han logrado adelantos importantes en el control del parásito y del vector en Latinoamérica, principalmente en los territorios abarcados por las iniciativas intergubernamentales del Cono Sur, Centroamérica, el Pacto Andino y la Amazonia junto con la Secretaría de la Organización Panamericana de la Salud. Estas iniciativas multinacionales propiciaron considerables disminuciones en la transmisión por vectores domésticos y en este mismo sentido se ha disminuido el riesgo en las transfusiones sanguíneas (OMS, 2016).

Se estima que, en Latinoamérica, existen cerca de dos millones de mujeres en edad reproductiva infectadas por *T. cruzi*, de las cuales entre un 4 a 8% tendrán la capacidad de transmitir la infección al feto por vía transplacentaria, lo que repercute en la frecuencia de niños que nacerían anualmente con enfermedad de Chagas congénita (ECC) la cual se estima en 15,000 niños anualmente (OPS, 2007).

Por otra parte, en México poco se sabe, del estado en el que se encuentra la ECC, aunque en gran parte de su territorio la EC es endémica. Por ello, se debe de considerar la importancia de realizar estudios que permitan determinar la tasa de transmisión congénita de *T. cruzi*. Algunos autores (Hotez *et al.*, 2013) señalan que todas las mujeres embarazadas residentes de zonas endémicas en México deben contar con acceso a pruebas diagnósticas y el tratamiento en caso necesario, después del parto o de la etapa de amamantamiento. Actualmente en México, los programas de control de vectores no son del todo formales y continuos Sandoval Ruiz *et al.*, 2004) y aun se intenta realizar un consenso con respecto a los métodos diagnósticos de la EC aguda y crónica en bancos de sangre y salas de maternidad (Carabarin-Lima *et al.*, 2013).

El programa de control ha pasado a través de los años por diversas etapas; en el período de 2001-2006 se formó un programa especial de acción a enfermedades transmitidas por vectores (incluido en el Programa Nacional de Salud 2001-2006) cuyo objetivo consistió en reducir los daños a la salud de las personas afectadas por la Enfermedad de Chagas mediante la prevención de la mortalidad y el tratamiento etiológico de la enfermedad aguda. La OPS (2003), describe algunos planes de acción para el control de estos vectores, recomiendan la implementación de un sistema de vigilancia entomológica que permita iniciar con el control químico de vectores. Así como, la promoción y el desarrollo de programas de mejoramiento a la vivienda y la eliminación de vectores y reservorios.

Aun se intenta realizar un consenso con respecto a los métodos diagnósticos de la EC aguda y crónica en bancos de sangre y salas de maternidad (Carabarin-

Lima *et al.*, 2013). Así mismo, el número de personas infectadas por las diferentes vías (a través de las heces de los triatomas, congénita, transfusional, trasplante de órganos y oral) en nuestro País aún no se determina por completo por lo que se considera que existe una subestimación de la situación actual de la EC en México que debe ser atendido (prevención y control).

2.3 Enfermedad de Chagas en México

La información sobre la prevalencia de la EC en México es poca, en comparación con el riesgo que representa para la salud pública (Salazar-Schettino *et al.*, 2007). Las tasas de seroprevalencia nacionales de la población se han evaluado en menor cantidad, comparándola con otras enfermedades emergentes.

Un estudio en 18 estados del País realizado por el Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológica (InDRE) en colaboración con los Centros Estatales de Transfusión Sanguínea (CETS), indica que en promedio el 1.5% de las muestras de donación contienen anticuerpos contra *T. cruzi* (Guzmán *et al.*, 1998). Diversos autores han colaborado, reportando una amplia variación en los valores de seroprevalencia en las donaciones a bancos de sangre en varios sitios de la república mexicana: 0.7–1.2% en Yucatán (Barrera *et al.*, 1992), 0.27% en el Instituto de Cardiología (Ramos *et al.*, 1991), 1.28% en Jalisco (Contreras *et al.*, 1992), 7.9% en el Hospital General de México (Rojo *et al.*, 1999), 0.3% del Instituto de Cardiología (Reyes *et al.*, 1999), y 1.03% de nuevo del Hospital General de México (Ramsey *et al.*, 2002). A partir de 1999 se iniciaron las pruebas de detección serológica para *T. cruzi* en donadores (Schmunis, 2007).

Ramsey *et al.*, (2003), realizaron estimaciones de la población mexicana que se encuentra en riesgo constante de la transmisión vectorial de la Enfermedad de Chagas (71 120 043 personas) y a su vez, aquellos que por su residencia ocasional en zonas infestadas (20 328 746 habitantes), de los cuales el 39.2% habita en comunidades rurales. Bajo estos criterios, estimaron que en promedio 1,766,376 de personas están infectadas actualmente; el 57% de esta población se

encuentra en zonas rurales, mientras que el 8.9% en zonas suburbanas. Estados como Chiapas, Veracruz, Guanajuato, Hidalgo, Puebla, Michoacán, México y Oaxaca tienen más del 69% de los casos reportados serológicamente positivos.

En un estudio integral en todo el estado de Veracruz los rangos de seropositividad por Jurisdicción Sanitaria señalan una distribución heterogénea de la infección, específicamente en Tuxpan, donde se encontró un 2.8% de prevalencia (Salazar-Schettino *et al.*, 2005).

La EC aún está dentro de las enfermedades con poca importancia para las autoridades de salud nacional correspondientes (Pérez *et al.*, 2011), a pesar de que nuestro País cuenta con características geográficas, climáticas y socioculturales, que favorecen la transmisión del parásito (Salazar-Schettino, 2011; OMS, 2016), además del incremento que se obtiene año con año de los reportes de casos humanos que se presentan en cada Estado.

Aun cuando en México se desconoce la prevalencia y la distribución de la EC, ésta es considerada como un problema de salud y definitivamente existen áreas donde el riesgo de infección es mayor debido a la presencia y convivencia con el transmisor en la vivienda humana, las características de la vivienda y el comportamiento biológico del parásito y del transmisor, además de la existencia de reservorios. Es importante resaltar que se han realizado estudios seroepidemiológicos en diferentes partes del País, empleando diferentes pruebas serológicas, debido a lo cual resulta difícil el poder comparar los resultados obtenidos (Olivera-Mar *et al.*, 2006; Gamboa-León *et al.*, 2011).

2.4 Agente causal

El género *Trypanosoma*, se caracteriza por utilizar dos huéspedes, uno vertebrado y otro invertebrado para completar su ciclo de vida y *T. cruzi* es una especie representativa de este género (Abad y Aguilar, 2000; Acha y Szyfres, 2003).

Trypanosoma cruzi presenta cuatro estadios morfológicos principales: tripomastigote sanguíneo, epimastigote, tripomastigote metacíclico y amastigote (Brenner, 1971). El insecto vector, adquiere al parásito *T. cruzi* al alimentarse de sangre de mamíferos los cuales se encuentren infectados, los parásitos se diferencian a epimastigotes en el lumen del intestino del insecto donde se multiplican de manera activa por fisión binaria, para posteriormente diferenciarse a la forma infectante que son los tripomastigotes metacíclicos (Abad y Aguilar, 2000). Después ocurre la transmisión vectorial, en la cual el insecto infectado se alimenta de un mamífero; el insecto defeca sobre él, liberando así tripomastigotes metacíclicos. El parásito atraviesa por soluciones de continuidad en piel o por mucosas debido al rascado en el sitio de la picadura. En los mamíferos los tripomastigotes usualmente se introducen en células fagocíticas y adquieren la forma de amastigote para multiplicarse por fisión binaria dentro de dichas células (formando los denominados nidos de amastigotes), las cuales terminan por lisarse liberando así los parásitos a sangre periférica en forma de tripomastigotes sanguíneos. El ciclo es completado cuando los tripomastigotes sanguíneos son ingeridos por un nuevo insecto vector no infectado (Abad y Aguilar, 2000; Acha y Szyfres, 2003).

Una característica importante en *T. cruzi* y otros tripanosomátidos es que poseen una estructura especializada conocida como cinetoplasto, el cual es una red de DNA extra nuclear localizada en un punto específico de la mitocondria (única en estos casos) (Cevallos y Hernández, 2001)

2.4.1 Variación genética de *Trypanosoma cruzi*

Durante los últimos años se han realizado grandes esfuerzos para explicar la variabilidad genética de *T. cruzi* con relación a su distribución geográfica y a su asociación con diferentes especies de triatomíneos y al comportamiento biológico que tienen las distintas cepas y aislados del parásito. Esta variabilidad genética se atribuye al intercambio genético y recombinación (Gaunt *et al.*, 2003).

Algunos trabajos (Tibayrenc y Miles, 1983; Tibayrenc *et al.*, 1986) contribuyeron en gran medida para el análisis del modo de multiplicación de este parásito en la naturaleza y se concluyó que *T. cruzi* se multiplica de manera asexuada generando así una estructura de las poblaciones esencialmente clonal. Esta estructura implica la existencia de entidades independientes (clones), las cuales pueden presentar propiedades biológicas diferentes. Por lo que las múltiples cepas o clones con características biológicas variables, pueden observarse en el tropismo celular, virulencia, manifestaciones clínicas y/o en el comportamiento *in vitro* del parásito. (Gaunt *et al.*, 2003).

Durante muchos años se han establecido diferentes tipos de clasificación para *T. cruzi*. En el último consenso en 2012, se establece el término de Unidad Discreta de Tipificación (por sus siglas en inglés DTU). Éste, fue propuesto para describir un conjunto de cepas que se encuentran genéticamente relacionadas entre sí. Estas DTU pueden establecer unidades confiables, que pueden ser identificadas por medio de marcadores moleculares. (Zingales *et al.*, 2012). En este consenso se incluyen seis unidades discretas de tipificación (DTU) nombradas como *T. cruzi* I (TcI), *T. cruzi* II (TcII), *T. cruzi* III (TcIII), *T. cruzi* IV (TcIV), *T. cruzi* V (TcV) y *T. cruzi* VI (TcVI), basada en marcadores moleculares diferentes y características biológicas (Zingales *et al.*, 2012; Guhl y Ramírez, 2013).

Los aspectos genéticos del parásito, juegan un papel muy importante en la patogénesis de la EC, como así también en la determinación de los tejidos que se verán afectados. Debido al polimorfismo biológico, diferentes clones de una cepa podrían ocasionar un tropismo especial hacia diferentes tejidos y así ser un factor determinante en el curso clínico de la enfermedad (Botero *et al.*, 2007). Todos los parásitos, independientemente de la DTU, son patogénicos para los humanos y potencialmente causantes de EC. Incluso existe la posibilidad de que los pacientes tengan infecciones mixtas que incluyan a dos o más DTU (Zingales *et al.*, 2009; Cura y Schijman, 2013). Esto pudiera ocasionar la detección diferenciada del parásito en diferentes órganos ya que ciertos genotipos manifiestan tropismo hacia algunos tejidos.

Estas diferencias entre DTUs que presenta *T. cruzi*, se debe a la formación de los nidos de amastigotes que realiza el parásito en los diferentes órganos. En 2007, Botero et al, identificaron que TcI presentó mayor tropismo por corazón, recto y tejido músculo esquelético. Mientras que el TcII predominó en bazo e hígado. Por lo cual dichos resultados confirman que las diferencias genéticas entre los grupos de *T. cruzi* podrían estar determinando el tropismo tisular y así cumplir un papel fundamental en el entendimiento de las manifestaciones clínicas de la EC.

Aunque no se han identificado factores genéticos candidatos además de la clasificación por DTUs, la creciente disponibilidad de tecnologías genómicas debería permitir avanzar en la delimitación de la medida en que la genética parasitaria contribuye a la evaluación del resultado de la enfermedad (Francisco et al., 2017).

Se ha descrito también un genotipo adicional, el cual está asociado específicamente a murciélagos (TcBat) en Brasil, Panamá y Colombia. Sin embargo, se siguen realizando estudios para la posible asignación de una DTU definitiva (Marcili et al., 2009; Guhl y Ramírez, 2011; Lima et al., 2015). La finalidad de contar con una nomenclatura estandarizada para *T. cruzi* es que contribuya para mejorar la comunicación científica y al mismo tiempo orientar futuras investigaciones sobre la epidemiología comparativa y la patología del parásito.

TcI se caracteriza por ser la DTU más abundante y distribuida de manera más amplia en el continente americano (Zingales et al., 2009; Cura y Schijman, 2013). A demás está presente en 52 géneros de mamíferos, infectados de manera natural, de los cuales destacan los marsupiales, roedores, primates, quirópteros y carnívoros por mencionar algunos. Se encuentra presente en la mayoría de los vectores y puede estar asociado con ciclos selváticos y domésticos. Se le atribuye hasta el 31.7% de los casos en humanos en todo el continente (Francisco et al., 2017). Así también se ha descrito, que la infección por TcI en casos clínicos se ha

llegado a complicar principalmente en las regiones de la Amazonia, andina central, América central y México; cabe mencionar que esta DTU se asocia con el desarrollo de cardiomiopatía chagásica (Bosseno *et al.*, 2002; Zingales, *et al.*, 2012).

En México el tipo de *T. cruzi* detectado en pacientes con cardiopatías y megasíndromes, así como en los reservorios silvestres y en los vectores, demuestran cierta diversidad, pero la mayoría pertenecen al DTU I (TcI). (Bosseno *et al.*, 2002; Martínez *et al.*, 2013; Cura y Schijman, 2013; Monteón *et al.*, 2014b). Otras DTU como TcII, y TcV han sido reconocidos en las partes centrales de México y en Veracruz se han reportado frecuencias de los cinco DTU, siendo el TcI y el TcV, los reportados con mayor porcentaje de incidencia en el vector (*Triatoma dimidiata*) TcI representó el 27%, y se informó por primera vez la presencia de cepas TcII, TcIII, TcIV y TcV en México, a una frecuencia relativamente alta, describiéndose entre un 13 al 27% de cada una (Ramos-Ligonio *et al.* 2012; Ibañez-Cervantes *et al.* 2013). Monteón *et al.* (2014a), confirmaron la presencia del TcI en Yucatán, siendo de mayor circulación el genotipo (recientemente llamado TcI dom). Cura *et al.* (2010), asocia a TcI dom con ciclos domésticos en el sureste y noreste de América del sur y ciclos selváticos en América central.

López-Cancino *et al.* (2015), en el sureste de México, encontraron TcI en el 91.7% de las especies de vectores capturadas, además se observó que un 18% de las especies de vida silvestre presentaron infección mixta con TcI y TcII donde se reveló la proporción de *T. dimidiata* infectados con el TcI en un 64% y un 8% de ellos, presentaban infección mixta con TcII. Cura *et al.* (2015), a través de protocolos de PCR múltiple utilizando PCR en tiempo real, pudieron excluir los seis DTU de *T. cruzi* utilizando sondas TaqMan (MTQ-PCR) específicas, con las cuales analizaron muestras de reservorios, vectores y pacientes de algunas zonas, entre los que se estudiaron algunas muestras de vectores y reservorios de Yucatán, reportándose una mayor frecuencia de TcI en reservorios. Sin embargo, en algunas muestras, se presentaron infecciones mixtas con TcI, siendo TcV y

TcVI con quienes se presentaron asociaciones, datos que concuerdan con lo reportado por López-Cancino *et al.* (2015). Entre 17% y 33% de las especies domésticas y periurbanas han sido reportadas infectadas con *T. cruzi* en la península de Yucatán; en lo que respecta a la explotación ganadera y las mascotas se reportan infecciones entre el 5 y 34% (Hernández *et al.*, 2010; Jiménez-Coello *et al.*, 2010; 2012a; 2012b; Monteón *et al.*, 2013; Carrillo-Peraza *et al.*, 2014).

2.4.2 Vector biológico

Los vectores de *T. cruzi* pertenecen a la familia Reduviidae y subfamilia Triatominae (Carcavallo *et al.*, 1999), se caracterizan por tener un aparato bucal tipo succionador y son estrictamente hematófagos. Los vectores de *T. cruzi* pueden llegar a habitar dentro de algunos hogares, principalmente aquellas que se encuentran en zonas rurales. Las viviendas precarias con techos de hojas de palma o paja otorgan condiciones ideales para la reproducción y alojamiento del vector (Acha y Szyfres, 2003). Actualmente se han identificado poco más de 150 especies de triatomíneos (Acha y Szyfres, 2003), de estas se conocen 30 especies en México (Acosta *et al.*, 2000). Si bien se conoce la presencia de vectores en las zonas rurales de las ciudades (Monteón *et al.*, 2013), también puede haber colonización de las viviendas urbanas por los vectores, aunque este hecho se ve afectado por el tipo de construcciones y el uso de insecticidas para control de otras plagas domésticas.

Trypanosoma cruzi se transmite en el sur de México, principalmente a través del vector *Triatoma dimidiata*, aunque otros triatomíneos están presentes y esporádicamente capturados incluso en los hábitats antrópicos: *Panstrongylus rufotuberculatus*, *Eratyrus cuspidatus*, *Triatoma nitida*, *Triatoma hegneri* (Ramsey *et al.*, 2015). *Triatoma dimidiata* infesta entre el 8% y el 61% de viviendas en la península, con colonización los índices entre el 5% y el 25% (Guzmán-Marin *et al.*, 1990; Dumonteil *et al.*, 2002; Hernández *et al.*, 2010; Monteón *et al.*, 2013). En Yucatán, *Triatoma dimidiata*, es el único vector transmisor de *T. cruzi*. Entre el 19

y 34% de los triatomíneos que invaden los domicilios en México y Centroamérica se encuentran infectados con *T. cruzi* (Dumonteil., 2002; Nakagawa *et al.*, 2005; Polonio *et al.*, 2009). *Triatoma dimidiata* es el único vector domiciliado en el estado de Veracruz, así como en los estados de Hidalgo, San Luis Potosí, Puebla y Estado de México. Algunos autores refieren que *T. dimidiata* se encuentra en diversos biotopos (Dumonteil *et al.*, 2002; Ramsey *et al.*, 2015).

2.4.3 Ciclos de transmisión

Las poblaciones de triatomas son clasificadas de acuerdo con su asociación a las viviendas humanas en: domiciliarias (casas), peri domiciliarias (patios) y silvestres, mismos que han sido creados a través de la compleja interacción entre los vectores, reservorios y el ambiente. Algunos autores (Reyes-Novelo *et al.*, 2011), han observado en estos últimos años que, *T. dimidiata*, presenta un proceso de transición y adaptación a la vivienda humana, del mismo modo que en patios y/o áreas circundantes a las viviendas (Salazar-Schettino, 2011).

El ciclo domiciliado (doméstico), el cual, deberá de considerarse como el de mayor importancia para la salud pública, puesto que involucra a mamíferos que conviven potencialmente con los seres humanos, como perros, roedores y gatos (OMS, 2002), y aquellos triatomíneos que se adaptan a las condiciones de las viviendas (Acha y Szyfres, 2003). En el ciclo peri domiciliado, también se ven involucrados los diversos animales domésticos criados por los pobladores para autoconsumo como es el caso de ovinos, bovinos y porcinos o especies de trabajo como los equinos (Zavala *et al.*, 1996; Gürtler *et al.*, 1991; Coura y Viñas, 2010).

El ciclo silvestre, es el que presenta una amplia distribución geográfica, encontrándose asociado a diferentes especies de vectores y hospederos silvestres (OMS, 2002). En Latinoamérica se han podido identificar a más de 15 especies de mamíferos infectados naturalmente con *T. cruzi* provenientes de

diferentes órdenes y familias como roedores, quirópteros, marsupiales y carnívoros (Noireau, 2009; Ceballos 2010).

2.5 Diagnóstico de la enfermedad de Chagas

Los métodos de diagnóstico específicos para la EC, consisten en la identificación directa del parásito o en la búsqueda de las reacciones inmunológicas correspondientes. Actualmente se realiza la detección del DNA del parásito por la reacción en cadena de la polimerasa (Acha y Szyfres, 2003).

El diagnóstico de la EC depende de la fase de la enfermedad. En la fase aguda, el diagnóstico puede realizarse por un examen directo con la finalidad de detectar al parásito en los fluidos corporales, específicamente en sangre. En la fase aguda la parasitemia es alta y el parásito se puede detectar fácilmente por sus estructuras y movimientos (La Fuente *et al.*, 1985; Azogue *et al.*, 1985).

Otras técnicas utilizadas para la observación directa del parásito incluyen la observación directa (frotis sanguíneo) y la técnica de micro hematocrito o prueba de Strout. Estos métodos presentan una sensibilidad del 60-70% (Luquetti, 2007; Balouz *et al.*, 2017). A pesar de ser uno de los más usados por su bajo costo, esta técnica no tiene una sensibilidad alta. Por otro lado, existen otros métodos rápidos y de costos accesibles en la detección de la enfermedad de Chagas, entre ellos la técnica de PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) que es más sensible que la detección directa y más rápida que el aislamiento. Sin embargo, debido a su variable sensibilidad y especificidad (ocasionada por la falta de armonización de procedimientos para realizarla) la OMS no la considera como un método de diagnóstico definitivo (Dias, 2015).

Las técnicas serológicas constituyen una importante herramienta en la confirmación del diagnóstico de la EC. En ciertas fases de la enfermedad el diagnóstico parasitológico es muy poco sensible debido a la baja parasitemia, lo que representa una de las principales complicaciones en serodiagnóstico de este protozooario (Cannova *et al.*, 2002; DGE-InDRE, 2015).

Las pruebas serológicas se dividen en dos grupos: las pruebas convencionales, que utilizan el extracto total de parásitos como antígeno, o extractos solubles de un complejo de antígenos y las pruebas no convencionales, que suelen utilizar antígenos recombinantes o péptidos sintéticos. El diagnóstico serológico da resultados diferentes según el tipo de antígeno usado, la fase de la enfermedad, y el tipo de inmunoglobulinas (IgM o IgG) a identificar (Cannova *et al.*, 2002; DGE-InDRE, 2015).

Lo primero en el diagnóstico de la EC aguda es realizar una correcta anamnesis para explorar información que nos permita saber sobre la posible exposición al *T. cruzi* en aquellos pacientes que exista sospecha clínica de infección o enfermedad: si el paciente reside o residió en un entorno donde pudo contagiarse mediante el insecto vector o si ha viajado a zonas endémicas, si se trata de un recién nacido, cual es el estatus serológico de la madre respecto a *T. cruzi* o si ha tenido un accidente en el laboratorio que implique al parásito.

Durante la etapa aguda, los estudios se centran en la visualización de *T. cruzi* en sangre ya que en las etapas iniciales de la enfermedad se encuentra una alta parasitemia y conforme transcurre la infección van disminuyendo hasta hacerse mínimas y aleatorias. Tanto en la fase crónica como indeterminada la parasitemia es baja y transitoria, por ello el diagnóstico se realiza fundamentalmente mediante el hallazgo de anticuerpos circulantes contra *T. cruzi*. Está bien documentado que las pruebas para la detección de anticuerpos son muy sensibles, pero su especificidad está limitada por su reactividad cruzada con anticuerpos de pacientes con otras parasitosis, como podría ser la leishmaniosis, la cual es una enfermedad con la misma distribución geográfica que la EC (Gil *et al.*, 2011).

Debido a esto, actualmente se busca mejorar este problema a través de técnicas más específicas como el Western Blot, considerada como una de las técnicas confirmatorias para el diagnóstico de la EC. Algunos autores reportan valores de especificidad del 100% y sensibilidad variable de entre un 86.6% a un 99%. (Escalante *et al.*, 2014), razón por la cual es una técnica diagnóstica por excelencia para la confirmación de casos.

En la actualidad, no se cuenta con un estándar de oro para el diagnóstico de la Enfermedad de Chagas, por lo que la Organización Panamericana de la Salud (OPS), describe el diagnóstico definitivo de la infección por *T. cruzi* cuando el resultado es positivo en al menos dos pruebas serológicas diferentes (ELISA, Inmunofluorescencia indirecta o Hemaglutinación Indirecta) que detectan anticuerpos específicos en el suero del paciente (OPS, 2007).

2.6 Vías de transmisión

El hombre se infecta por contaminación con las formas metacíclicas del parásito las cuales se encuentran en las heces de numerosas especies de hemípteros de la subfamilia Triatominae (Kollien y Schaub, 2000). Recientemente la transmisión oral se ha identificado en algunos países, reportando brotes en años recientes (Pereira *et al.*, 2009). Así también la infección chagásica puede transmitirse de la madre al producto durante el embarazo, otras veces a través de transfusiones de sangre, trasplantes de órganos, y accidentes en el laboratorio (Moraes-Souza, 2000; Sanmartino *et al.*, 2000).

La transmisión vertical de *T. cruzi* puede ocurrir en cualquier fase de la gestación, ocasionando infección chagásica en el feto que puede manifestarse con retardo en el crecimiento intrauterino, hepatomegalia y esplenomegalia, compromiso variable del sistema nervioso central, el miocardio, deformaciones, y abortos en algunos casos (Cura y Shijman, 2013).

2.7 Transmisión congénita de *T. cruzi*

Existen evidencias que la vía congénita para la EC se ha incrementado año con año (Kemmerling *et al.*, 2010), esto posiblemente por las constantes migraciones poblacionales desde las áreas endémicas hacia diversos continentes y al fenómeno de urbanización de las regiones (Moya *et al.*, 2005).

Cabe mencionar que esta vía es relativamente más frecuente en aquellas regiones donde el control de la transmisión vectorial y transfusional están resueltos, incluyendo centros urbanizados endémicos y no endémicos, asociado

probablemente a la migración de mujeres latinoamericanas a otras regiones (Freitas *et al.*, 2005; Cura y Schijman, 2013).

A nivel mundial se han realizado algunos reportes de la prevalencia de la Enfermedad de Chagas en mujeres embarazadas, así como la prevalencia de la TC de la misma. En Barcelona 3.5% (Otero *et al.*, 2012), en Perú se han descrito prevalencias por debajo del 2% (0.73%) (Mendoza *et al.*, 2005). En Bolivia esta prevalencia es mayor en comparación con los anteriores (23.6%) (Suéscun-Carrero *et al.*, 2017) y en Chile (57.2%) reportada por Salas-Calvijo *et al.*, 2012).

Asimismo, en un estudio realizado en la provincia de Choapa, Chile, demostró una seroprevalencia de 3.4% de la infección por *T. cruzi* (con presencia de los DTU I y DTU II) en mujeres embarazadas y una tasa de TC del 4.7% (Apt *et al.*, 2013). En estudios realizados por Gurtler *et al.* (2003) en Argentina, se describe que existe una probabilidad entre 2.6% y 6.7% que se dé la TC de la EC en las mujeres embarazadas según las áreas geográficas del país (endémica o no endémicas) donde habiten. En Colombia se reportó un 2.7 a 3.5% de prevalencia en mujeres embarazadas y una TC del 20%, siendo de mayor frecuencia del DTU I (6 de 9 muestras) también, describieron la presencia de una muestra con infección mixta con DTUs I y II (Manrique-Abril *et al.*, 2013).

La OMS informó que aproximadamente 243,000 mujeres en México son fértiles y se infectaron con EC, por lo que se prevé que al menos 1,100 recién nacidos pudieran estar en riesgo de infección cada año (OMS, 2016). Cardoso *et al.* (2012), describió que la prevalencia de infección en las mujeres embarazadas fue de 4.4%, en Oaxaca, 12.02% en Jalisco y 4.12% en la ciudad de México. Así mismo, la tasa de transmisión materno-fetal se reportó con el 4.08% en Oaxaca y 9.1% en Jalisco, lo que demuestra la alta prevalencia de la transmisión congénita en el País, cabe mencionar que el diagnóstico fue realizado a partir de muestras serológicas de las madres y de técnicas moleculares de muestras obtenidas del cordón umbilical en los recién nacidos.

En los casos de infección congénita reportados (Burgos *et al.*, 2007) se han identificado a todas las DTU de *T. cruzi* excepto el Tc IV (Burgos *et al.*, 2007; Del

Puerto *et al.*, 2010). La prevalencia de las DTU específicas en la infección congénita se da de acuerdo con la prevalencia observada en la población general infectada de la misma región (Corrales *et al.*, 2009).

Durante el embarazo, las mujeres infectadas pueden transmitir el parásito, ya sea en fase aguda o crónica. (Paricio-Talayero, 2008). Las infecciones congénitas ocurren entre el 1 al 12% de los bebés nacidos de madres infectadas. En países donde el parásito es endémico, como México, se ha descrito una mayor tasa de TC en comparación con los países donde no es endémica; 5.0% en Chiapas y 3.5% en Veracruz (Cardoso *et al.*, 2012).

Parte de la fisiopatología de la infección congénita ha sido verificada por numerosas investigaciones tanto en la placenta como en el producto. Algunos autores (Bittencourt, 1976; Freilij y Altcheh, 1994) han encontrado relación en las infecciones durante la gestación con mortinato, abortos, lesiones del músculo esquelético, corazón, piel, esófago e intestino. Dependiendo de la virulencia, patogenicidad y procedencia de los parásitos que producen infecciones intrauterinas (Alarcón *et al.*, 2006). Sala *et al.* (2006) sugieren que las lesiones causadas en la placenta y en los fetos depende de la heterogeneidad de las cepas de *T cruzi*, lo cual juega un papel muy importante en la transmisión congénita.

2.8 La placenta y la Enfermedad de Chagas en la gestación

La placenta es un órgano transitorio de origen materno y fetal, cuyas principales funciones son endocrinas y de intercambio metabólico entre madre y feto. Tiene como fin generar un medio de unión, así como intercambio de oxígeno y nutrientes entre las estructuras fetales y maternas (Llusía, 1992; Guerrero, 2009).

La barrera placentaria está compuesta por tejidos extra fetales que separan la sangre materna de la del feto en el espacio intervelloso. Hasta la semana 20 de gestación, esta barrera está compuesta por sincitiotrofoblasto, citotrofoblasto, tejido conectivo del estroma veloso de las vellosidades coriónicas y endotelio capilar fetal.

Pasado este tiempo, la barrera placentaria sufre adaptaciones funcionales que favorecen el intercambio metabólico. Las células citotrofoblásticas disminuyen, y los núcleos de las células del sincitiotrofoblasto se agrupan formando nodos (Llusía, 1992). Esta reestructuración ocasiona que la barrera placentaria se adelgace localmente.

Los parásitos pueden llegar al feto vía hematógena, a través de la placenta (Bittencourt, 1976; Andrade, 1982; Carlier, 2005), sin embargo, la fisiopatología de la infección congénita no está clara (Kemmerling *et al.*, 2010; Moya, 2010). Se considera que la ECC es el resultado de una compleja interacción entre la respuesta inmune materna, los factores placentarios, y las características del parásito (Carlier, 2005; Burgos, *et al.*, 2007).

Cevallos *et al.* (2014) mencionan que la transmisión congénita de la EC durante el primer trimestre (1- 12 semanas) es poco probable, ya que el espacio de las vellosidades en la placenta no está abierto del todo, debido al taponamiento del trofoblasto endovascular en las arterias espirales (Llusía, 1992).

Actualmente, para considerar que un caso de ECC es positivo, deben considerarse tres parámetros: la seropositividad de la madre, la detección de parásitos en sangre periférica del recién nacido y la detección de parásitos en los recién nacidos o en su defecto los anticuerpos específicos anti-*T. cruzi* en un tiempo posterior al parto (6 a 9 meses), esto solo si la contaminación por transfusión o exposición vectorial puede descartarse (Carlier, 2005).

Durante la gestación, hay una respuesta inmune predominante de la madre que favorece la tolerancia inmunológica al feto (Raghupathy, 2001; Raghupathy y Kalinka 2008), pero a su vez, eleva la posibilidad de infecciones intracelulares. La infección por *T. cruzi* congénita se asocia con trabajo de parto prematuro, bajo peso al nacer, y mortinatos (Bittencourt, 1976; Altemani, 2000; Shippey *et al.*, 2005). Alrededor del 50% de los bebés prematuros nacidos de madres con Chagas no sobreviven (Shippey *et al.*, 2005).

Es importante destacar que los factores que intervienen en la determinación del riesgo de transmisión son principalmente factores maternos, la fase de la Enfermedad de Chagas, el estado inmunológico, la historia obstétrica y la carga parasitaria (Dumonteil 1999; Kemmerling *et al.*, 2010; Cevallos *et al.*, 2014). Gran número de mujeres embarazadas no presentan signos clínicos o síntomas sugestivos a la infección por *T. cruzi*. Una vez infectado el feto, éste puede sufrir alteraciones en su desarrollo o incluso en su viabilidad, lo cual dependerá del momento en que se dé la infección (Yáñez del Solar, 2011).

Contreras *et al.* (1999) y Moretti *et al.* (2005) mencionan que *T. cruzi*, puede infectar a la placenta sin producir daño en el feto, o puede ser que este parásito no afecte al feto ni a la placenta; las razones por las que pudiera darse uno u otro se desconocen (Kemmerling *et al.*, 2010). Existe muy poca evidencia sobre la sintomatología de la ECC en los recién nacidos, ya que no hay estudios definitivos que describan estas características; se cree que las manifestaciones clínicas del niño infectado pueden producirse durante toda la gestación, o justo al momento del parto (Moya *et al.*, 2005)

Carlier y Truyens (2015) sugieren que la transmisión de *T. cruzi* al feto (Figura A), puede ocurrir cuando los parásitos vienen de la pared uterina (vía trans-uterina), del líquido amniótico (vía oral) o la transmisión postnatal mediante la lactancia materna sigue siendo una posibilidad en la infección aguda o la infección reactivada (una infección masiva que ha sido observado en ratones gestantes infectados agudamente con *T. cruzi*) (Mjihdi *et al.*, 2002). Se menciona que estas rutas son poco probables en la infección crónica (Bittencourt *et al.*, 1988, Virreira *et al.*, 2006b, Carlier y Truyens, 2010, Cencig *et al.*, 2013; Norman y López-Vélez, 2013). Por lo tanto, la placenta es el órgano fetal clave frente a los parásitos presentes en el espacio sanguíneo intervilíneo en el que puede existir una infección transplacentaria por la invasión del trofoblasto veloso, la presencia de alguna fisura o desgarré en el tejido placentario o al mismo momento del parto en el cual los sangrados llegan a ser poco controlados. En el cual se puede dar la infección por la invasión del trofoblasto veloso, la presencia de alguna fisura o

desgarre en el tejido placentario, incluso al mismo momento del parto en el cual los sangrados llegan a ser poco controlados.

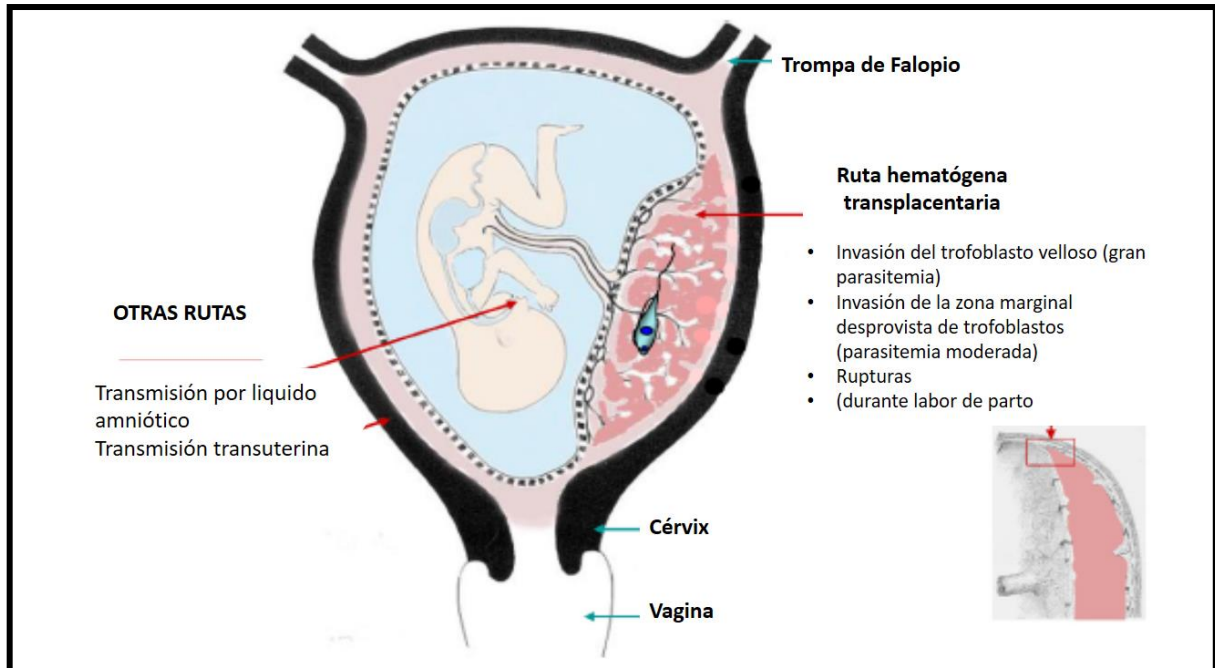


Figura A. Posibles rutas de transmisión materno-fetal de *T. cruzi*. Tomado de Carlier y Truyens 2015

2.9 Modelos animales empleados en la transmisión congénita de la Enfermedad de Chagas

En modelos animales, ha sido demostrada la TC de *T. cruzi* (Carlier y Torrico, 2003; Moreno *et al.*, 2006) observándose, la presencia de parásitos en el útero grávido y en el líquido amniótico de ratas Wistar en fase aguda de la infección, así como nidos de amastigotes en el músculo cardíaco de los fetos de ratas empleando una cepa de TcII. Alarcón *et al.* (2006) usando una cepa perteneciente

a TcII en ratas gestantes que previamente habían sido infectadas, reportaron nidos de amastigotes presentes hasta en un 25% de la placenta.

Pérez *et al.* (2008) describieron las anomalías morfológicas y estructurales en fetos de ratas gestantes con un cuadro de infección aguda, destacando que el 15% de los fetos presentaron protuberancias macroscópicas sobre la porción dorsal del cuerpo a nivel de la columna vertebral y algunos lo presentaron en las patas superiores, mismas que se debían al exceso de infiltrado celular mononuclear con linfocitos, macrófagos, histiocitos y monocitos. Estos autores describen que, en este modelo animal, la infección con tripomastigotes sanguíneos de las cepas I/PAS/Ve/00/Planalto y la cepa M/HOM/Ve/92/ASM produce en ratas gestantes una restricción patológica del crecimiento fetal, anomalías morfológicas estructurales y funcionales en los fetos y muerte fetal.

Moreno *et al.* 2006 reportaron diferencias significativas en pesos y alteraciones morfométricas en los fetos de ratas Wistar gestantes infectadas con una cepa de TcII, la cual no causó interrupción de la gestación. Por otra parte, Alkmim-Oliveira *et al.* (2013) evaluaron el comportamiento biológico y la TC de *T. cruzi* asociado con parasitemia materna inducidas por cepas TcI y TcV, demostrando que ambas son capaces de generar respuestas parasitarias altas. Sin embargo, la presencia de nidos de amastigotes solo se presentó en una de las crías infectadas con la cepa de TcI. El porcentaje de transmisión congénita para TcI y TcV fue de 58.1 y 46.6% % respectivamente.

Con estos reportes se evidencia la necesidad de investigar en otros modelos animales infectados experimentalmente con diferentes cepas de *T. cruzi* a fin de obtener nuevos resultados que permitan generalizar las observaciones señaladas. Moreno *et al.* (2006) y Alarcón *et al.* (2006) recomiendan repetir estos experimentos con aislados representativos de TcI y TcII para poder concluir que no se producen alteraciones en el embarazo producto de la infección con *T. cruzi* en el curso de la infección chagásica.

2.9.1. *Cavia porcellus* como modelo experimental en la Enfermedad de Chagas Congénita

Se conoce que muchas especies de mamíferos son susceptibles a la infección por *T. cruzi*, incluidos ratones, hámster, cerdos, perros y primates como se describió anteriormente. El conejillo de indias (*Cavia porcellus*) es un reservorio natural para *T. cruzi*. Sin embargo, poco ha sido su uso como modelo experimental.

Estudios realizados en Perú (Herrer, 1955) y Bolivia (Levy *et al.*, 2006), donde la cría de conejillos de indias como sistemas de producción para el consumo de carne, se hallaron lesiones cardíacas en animales infectados naturalmente. Milei *et al.*, (1989) encontraron lesiones cardíacas en animales de entre 6 y 9 meses. Por lo cual, se sugiere su uso como modelo experimental. Algunos trabajos se han enfocado en infecciones agudas (Nargis *et al.*, 2001; Pérez Brandán *et al.*, 2006).

El modelo presenta algunas ventajas sobre los modelos frecuentes (ratas y ratones). Castro-Sesquen *et al.* (2011) en un trabajo realizado con *Cavia porcellus* describe que durante la fase aguda no hubo mortalidad. El tamaño del ejemplar favorece su manejo y la colección de muestras como orina y/o sangre sin sacrificar al animal. Además, la placentación que presenta esta especie es hemocorial similar a la del humano, así como un homólogo proceso de invasión del trofoblasto ante la presencia de algún patógeno. Por último, presenta un periodo mayor de gestación (65 días) en comparación con ratones (21 días) lo cual permite inocular en diferentes etapas de la gestación (Leiser y Kaufmann, 1994; Mess, 2007).

Debido a que la prevalencia varía en función del momento de la infección (antes o durante la gestación) o por las DTU prevalentes en la región geográfica (Freilij *et al.*, 2007; Corrales *et al.*, 2009), se justifica la necesidad de desarrollar más estudios que permitan conocer más respecto al tema y así mismo definir el riesgo global de la EC y su TC, desafortunadamente poco se sabe sobre esta última y mucho menos si se da de manera homogénea entre las diversas DTU de cada

región pues no hay suficientes estudios *in vivo* que demuestren el curso de infección antes o durante la gestación (Solís *et al.*, 2003; Alarcón, *et al.*, 2006).

Por ahora, en México, no se realiza un tamizaje diagnóstico rutinario en las mujeres embarazadas para detectar la presencia de infección y/o prevenir el riesgo de la TC de la EC en los recién nacidos. De ahí radica la importancia en el área de salud pública, de manera que los laboratorios clínicos consideren la incorporación de una prueba diagnóstica para la detección de la EC, sobre todo en zonas endémicas de la infección. Los resultados de algunos autores (Moreno *et al.*, 2006; Alarcón *et al.*, 2006; Alkmim-Oliveira *et al.*, 2013; Vela-Bahena *et al.*, 2015) permiten estimar el riesgo potencial de transmisión de la EC por formas no vectoriales en áreas no endémicas, lo que demuestra que la TC y la transfusión de sangre son importantes formas de propagación de la Enfermedad de Chagas, misma que representa un grave problema de salud.

Se requiere generar nueva información para dilucidar mediante modelos experimentales apropiados, la frecuencia de TC de las DTU de *T. cruzi* con mayor circulación en el sureste mexicano.

III. OBJETIVO GENERAL

Establecer como modelo experimental al conejillo de indias (*Cavia porcellus*) en la transmisión congénita de *T. cruzi* (DTU I).

3.1 Objetivos específicos

- Establecer un protocolo de la infección experimental con *T. cruzi* (DTU I) en conejillo de indias (*Cavia porcellus*)
- Medir el efecto de la exposición a *T. cruzi* (DTU I) antes de la gestación en términos de indicadores ginecoobstétricos, carga parasitaria y lesiones histológicas
- Medir el efecto de la exposición a *T. cruzi* (DTU I) durante la gestación en dos etapas de la gestación términos de indicadores ginecoobstétricos, carga parasitaria y lesiones histológicas

IV. BILIOGRAFÍA

1. Abad, F., Aguilar, M. 2000. Control de la Enfermedad de Chagas en el Ecuador. Datos y reflexiones para una política de estado. Revista del instituto Juan Cesar García 10: 12-32.
2. Acha, P., Szyfres, B. 2003. Zoonosis y Enfermedades Transmisibles Comunes al Hombre y a los Animales. 3rd Ed. Washinton D.C.
3. Acosta, V., Ibañez, S., Martínez, C. 2000. Infección natural de chinches Triatominae con *Trypanosoma cruzi* asociada a la vivienda humana en México. Salud Pública de México. 42:496-503.
4. Alarcón, M., Lugo de Yarbuh A., Moreno, E., Payares, G., Araujo, S., Colmenares, M. 2006. Presencia de *Trypanosoma cruzi* en tejidos de ratas Wistar infectadas experimentalmente y sus fetos. Boletín de Malariología y Salud Ambiental 46; 137- 148.
5. Alkmim-Oliveira, S.M., Costa-Martins, A.G., Kappel, H.B., Correia, D., Ramirez, L.E., Lages-Silva, E. 2013. *Trypanosoma cruzi* experimental congenital transmission associated with TcV and TcI subpatent maternal parasitemia. Parasitology Research 112: 671-678.
6. Altemani, A.M., Bittencourt, A.L., Lana, A.M. 2000. Immunohistochemical characterization of the inflammatory infiltrate in placental Chagas' disease: a qualitative and quantitative analysis. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, 62: 319-324.
7. Andrade, A. L. S., Martelli, C. M., Oliveira, R. M., Silva, S. A., Aires, A. I., Soussumi, L. M., Dimas T. Covas, Luiz S. Silva, João G. Andrade, Luiz R. Travassos, Igor C. Almeida. 2004. Benznidazole efficacy among *Trypanosoma cruzi* infected adolescents after a six-year follow-up. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, 71(5), 594-597.
8. Andrade, Z.A. 1982. Patogenia da doença de Chagas. Novos aspectos. Arq Bras Cardiol 38:255-260.
9. Apt, W., Zulantay, I., Arnello, M., Oddó, D., González, S. Rodríguez, J. 2013. Congenital infection by *Trypanosoma cruzi* in an endemic área of Chile: a multidisciplinary study. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene 207: 98-104
10. Azogue, E., La Fuente, C., Darras, C.H. 1985. Congenital Chagas' disease in Bolivia: epidemiological aspects and pathological findings. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, 79:176-180.
11. Balouz, V., Agüero, F., Buscaglia, A. 2017. Chagas disease diagnostic applications: present knowledge and future steps. Adv Parasitol. 97: 1–45. doi:10.1016/bs.apar.2016.10.001.
12. Barr, S. 2000. Tripanosomiasis Americana En: Greene G. Enfermedades infecciosas en perros y gatos. McGraw Hill, México 490-495

13. Barrera, M.A., Rodríguez, M.E., Guzmán, E., Zavala, J.E. 1992- Prevalencia de la enfermedad de Chagas en el estado de Yucatán. *Revista Biomédica*. 3:133-139
14. Bittencourt, A.L. 1976. Congenital Chagas disease. *American Journal of Diseases of Children*, 130: 97-103.
15. Blanco, S. B., Segura, E.L., Cura, E.N., Chuit, R., Tulián, L., Flores, I., Garbarino, G., Villalonga, J.F., Gürtler, R. E. 2000. Congenital transmission of *Trypanosoma cruzi*: an operational outline for detecting and treating infected infants in north-western Argentina. *Tropical Medicine and International Health*, 5: 293–301.
16. Bosseno, M.F., Barnabe, C., Magallon-Gastelum, E., Lozano-Kasten, F., Ramsey J., Espinoza, B. 2002. Predominance of *Trypanosoma cruzi* lineage I in Mexico. *Journal of Clinical Microbiology*. 40:627-632.
17. Botero, L. A., Mejía, M. A. Triana, O. 2007. Caracterización biológica y genética de dos clones pertenecientes a los grupos I y II de *Trypanosoma cruzi* de Colombia. *Biomédica* 27:64-74.
18. Brener, Z. 1971. Life cycle of *Trypanosoma cruzi*. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*. 12:171-178.
19. Burgos, J.M., Altcheh, J., Bisio, M., Duffy, T., Valadares, H.M.S., Seidenstein, M.E., Piccinalli, R., Freitas, J.M., Lvin, M.J., Macchi, L., Macedo, A.M., Freilij, H., Schijman, A.G. 2007. Direct molecular profiling of minicircle signatures and lineages of *Trypanosoma cruzi* bloodstream populations causing congenital Chagas disease. *International Journal for Parasitology* 37:1319-1327.
20. Cabello, C., Cabello, C.F. 2008. Zoonosis con reservorios silvestres: Amenazas a la salud pública y a la economía. *Revista médica de Chile*, 136: 385-393.
21. Cannova, D., M. Aguilar, M. Pacheco M. Simona, M. Medina. 2002. Validación del inmunoensayo enzimático (ELISA) y hemoaglutinación indirecta (HAI) para el serodiagnóstico de la enfermedad de Chagas. *Salus* 6:4-9
22. Carabarin-Lima, A., M.C. González-Vázquez, O. Rodríguez-Morales, L. Baylón Pacheco, J.L. Rosales-Encina, P.A. Reyes-López, M. Arce-Fonseca. 2013. Chagas disease (American trypanosomiasis) in Mexico: an update. *Acta Tropicaica*, 127: 126-135.
23. Carbajosa-González, S. 2014. Alteraciones en la hematopoyesis y el metabolismo de la L-arginina durante la infección aguda experimental por *Trypanosoma cruzi*. Tesis Doctoral. Universidad Autónoma de Madrid. Revisado 10/09/2016: www.repositorio.uam.es/bitstream/handle/10486/660501/carbajosa_gonzalez_silvia.pdf?sequence=1
24. Carcavallo, R., Girón, I., Jurberg J., Lent. H. 1999. Atlas of Chagas Disease Vectors in the Americas. Instituto Fiocruz. Brasil. Volumen III

25. Cardoso, E.J., Valdéz, G.C., Campos, A.C, Sanchez, R.D., Mendoza, C.R., Hernández, A. P., Ramírez, M.H., Habana, J.R., González, E.B., Matzumura, P.D., Carlier, Y. 2012. Maternal fetal transmission of *Trypanosoma cruzi*: A problem of public health little studied in Mexico. *Experimental Parasitology* 13: 425-432.
26. Carlier, Y. 2005. Factors and mechanisms involved in the transmission and development of congenital infection with *Trypanosoma cruzi*. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 38 (Supl. 2): 105-107.
27. Carlier, Y., 2015. Congenital Chagas disease as an ecological model of interactions between *Trypanosoma cruzi* parasites, pregnant women, placenta and fetuses. *Acta Tropica* 151:103-115.
28. Carlier, Y., Torrico, F. 2003. Congenital infection with *Trypanosoma cruzi*: from mechanisms of transmission to strategies for diagnosis and control. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* L:767-771.
29. Castro-Sesquen, Y.E., Gilman, R.H., Yauri V. 2011. *Cavia porcellus* as a Model for Experimental Infection by *Trypanosoma cruzi*. *The American Journal of Pathology*. 2011;179(1):281-288. doi:10.1016/j.ajpath.2011.03.043.
30. Ceballos, L. 2010. Ciclo silvestre de transmisión de *Trypanosoma cruzi* en el noroeste de Argentina. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias Exactas. Universidad de Buenos Aires.
31. Cevallos, A.M, R. Hernández. 2014. Chagas' disease: pregnancy and congenital transmission. *BioMed Research International*. Article ID 401864.
32. Cevallos, A.M., Hernández, R. 2001. *Trypanosoma cruzi* y la enfermedad de Chagas (tripanosomiasis americana). *Microbios en línea*. Departamento biología molecular, instituto de investigaciones biomédicas, UNAM (19). México. Disponible en <http://www.microbiologia.org.mx/microbiosenlinea/Capitulo19.pdf>. Consultado 10/07/2017.
33. Chagas, C. 1909, Nova especie mórbida do homen, produzida por um *Trypanosoma* (*Trypanosoma cruzi*). Nota previa. *Brasil Medico*. 23:161.
34. Contreras, M.C., Salinas P., Sandoval L., Solís F., Rojas, A. 1992. Usefulness of the ELISA-IgG test in sera and filter paper blood eluates in the Chagas disease immunodiagnosis. *Boletín Chilena de Parasitología*. 47:76-81
35. Contreras, S., M.R. Fernández, F., Aguero, J., Desse, D., Orduna T., Martino, O. 1999. Enfermedad de Chagas-Mazza congénita en Salta. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 32: 633-636.
36. Corrales, R.M., Mora, M.C., Negrette, O.S., Diosque, P., Lacunza, D., Virreira, M., Breniere, S.F., Basombrio, M.A. 2009. Congenital Chagas disease involves Formatted: Highlight Formatted: Highlight *Trypanosoma cruzi* sub-lineage IId in the northwestern province of Salta, Argentina. *Infection, Genetics and Evolution* 9: 278-282.
37. Cruz-Reyes, A., Pickering-López, J.M. 2006. Chagas disease in Mexico: an analysis of geographical distribution during the past 76 years-A review. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 101: 345-354.

38. Cura, C., Mejia-Jaramillo, A.T., Duffy, J., Burgos, M., Rodriguez, M., Cardinal, S., Kjos, R., Gurgel-Goncalves, D., Blanchet, L., de Pablos, N., Tomasini, A., da Silva, O., Russomando, C., Cuba, C., Aznar, T., Abate, M., Levin, A., Osuna, R., Gürtler, P., Diosque, A., Solari, O. 2010. *Trypanosoma cruzi* I genotypes in different geographical regions and transmission cycles based on a microsatellite motif of the intergenic region spacer of spliced-leader genes. *International Journal for Parasitology* 40:1599-1607.
39. Cura, C., Schijman, A.G. 2013. Relación entre los genotipos de *T. cruzi* y la presentación clínica de la enfermedad de chagas. *Revista Española de Salud Pública* 86: 9-16.
40. Cura, C.I., Duffy, T., Lucero, R.H., Bisio, M., Péneau, J., Jimenez-Coello, M., Calabuig, E., Gimenez, Valencia Ayala, M.J.E., Kjos, S.A., Santalla, J., Mahaney, S.M., Cayo, N.M., Nagel, C., Barcán, L., Málaga Machaca, ES, Acosta Viana, K.Y., Brutus, L., Ocampo, S.B., Aznar, C., Cuba Cuba, C.A., Gürtler, R.E., Ramsey, J.M., Ribeiro, I., Vandenberg, J.L., Yadon, Z.E., Osuna, A., Schijman, A.G., 2015. Multiplex Real-Time PCR assay using Taqman probes for the identification of *Trypanosoma cruzi* DTUs in biological and clinical samples. *PLOS Neglected Tropical Diseases* 9, e0003765
41. Dalmasso, A.P., Jarvinen J.A. 1980. Experimental Chagas' disease in complement-deficient mice and guinea pigs. *Infection and Immunity* 28: 434
42. Del Puerto, R., J.E. Nishizawa, M. Kikuchi, N. Iihoshi, Y. Roca, L. Avilas, A. Gianella, J. Lora, F.U. Gutierrez, L.A. Ranjel, S. Miura, N. Komiya, K. Maemura y K. Hirayama. 2010. Lineage analysis of circulating *Trypanosoma cruzi* parasites and their association with clinical forms of Chagas disease in Bolivia. *PLOS Neglected Tropical Diseases* 5, e687.
43. Desai, M., Ter Kuile, F. O., Nosten, F., McGready, R., Asamo, K., Brabin, B., Newman, R.D. (2007). Epidemiology and burden of malaria in pregnancy. *The Lancet Infectious Diseases* 7: 93-104.
44. Dias, J. C. 2015. Chagas disease: still a challenge around the World. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 48:367-369.
45. Dumonteil, E. 1999. Update on Chagas disease in Mexico. *Salud Pública de México* 41:322-327.
46. Dumonteil, E., Gourbière, S., Barrera-Pérez, M., Rodríguez-Félix, E., Ruiz-Piña, H., Baños-Lopez, O., Rabinovich, J.E. 2002. Geographic distribution of *Triatoma dimidiata* and transmission dynamics of *Trypanosoma cruzi* in the Yucatan peninsula of Mexico. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 67: 176-183.
47. Escalante, H., C. Jara, K. Davelois, M. Iglesias, A. Benites, R. Espinoza. 2014. Estandarización de la técnica de western blot para el diagnóstico específico de la enfermedad de Chagas utilizando antígenos de excreción-secreción de los epimastigotes de *Trypanosoma cruzi*. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*, 31: 644-651.

48. Figueroa D.R. 1998. Riesgos de transmisión enfermedades infecciosas por transfusión. *Revista Ginecología y Obstetricia de México* 66: 277-283. Freilij H., Biancardi M. 2007. Enfermedad de Chagas Congénito. Mesa Redonda "Formas de transmisión congénita"; 1-12. Disponible en: URL: <http://www.fac.org.ar/fec/chagas2/llave/md3/md301/freilij.htm> (Consultado: agosto 12, 2017).
49. Francisco, A.F., Jayawardhana, S., Lewis, M. D., Taylor, M. C., Kelly, J. M. 2017. Biological factors that impinge on Chagas disease drug development. *Parasitology*, 1-10.
50. Freitas, H.F., P.R. Chizzola, A.T. Paes, A.C. Lima, A.J. Mansur. 2005. Risk stratification in a Brazilian hospital-based cohort of 1220 outpatients with heart failure: role of Chagas' heart disease. *International Journal of Cardiology* 102: 239-247.
51. Gamboa-León, R., C. Gonzalez-Ramirez, N. Padilla-Raygoza, S. Sosa-Estani, A. Caamal-Kantun, P. Buekens, E. Dumonteil. 2011. Do commercial serologic tests for *Trypanosoma cruzi* infection detect Mexican strains in women and newborns? *Journal of Parasitology* 97:338-343.
52. Gaunt, M.W., M. Yeo, I.A. Frame, J.R. Stothard, H.J. Carrasco, M.C. Taylor, S.S. Mena, P. Veazey, G.A.J. Miles, N. Acosta, A.R. de Arias, M. A. Miles. 2003. Mechanism of genetic exchange in American trypanosomes. *Nature*. 421: 936-939
53. Gil, J., R. Cimino, I. López Quiroga, S. Cajal, N. Acosta, M. Juaréz, J. Nasser. 2011. Reactividad del antígeno GST-SAPA de *Trypanosoma cruzi* frente a sueros de pacientes con enfermedad de Chagas y leishmaniasis. *Medicina (Buenos Aires)*, 71:113-119.
54. Guerrero, C.E. 2009. Participación del óxido nítrico placentario en el proceso de interiorización del *T. cruzi* en vellosidades coriales humanas Tesis licenciatura. Universidad de Córdoba, España. P. 34 -56.
55. Guhl F, J.D. Ramírez. 2013. Retrospective molecular integrated epidemiology of Chagas disease in Colombia infection. *Infection, Genetics and Evolution* 20: 148-154.
56. Guhl, F., J.D. Ramírez. 2011. *Trypanosoma cruzi* diversity: towards the need of genetic subdivision? *Acta Tropica*, 119: 1-4.
57. Gurtler, R.E., M.C. Cecere, M.A. Lauricella, M.V. Cardinal, U. Kitron, J.E. Cohen. Domestic dogs and cats as sources of *Trypanosoma cruzi* infection in rural northwestern Argentina. *Parasitology*, 134 (2007), pp. 69–82
58. Guzmán-Bracho, C., S. Lahuerta, O. Velasco-Castrejón. 1998. Chagas disease. First congenital case report. *Archives of Medical Research* 29:195-196.
59. Guzmán-Marín, E., Zavala-Castro, J., Acosta-Viana, K., Rosado-Barrera, M. 1999. Importancia de la caracterización de cepas de *Trypanosoma cruzi*. *Revista Biomédica*, 10:177-184.

60. Herrer, A. 1955. Trypanosomiasis americana en el Perú III. Importancia del cobayo como reservorio de la enfermedad de Chagas en la región sudoccidental. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Publica*. 9:1-2.
61. Herrera, L., C.M. Aguilar, A. Brito, A. Morocoima. 2007. Conocimiento y riesgo de infección para la Tripanosomosis americana o Enfermedad de Chagas en áreas rurales de Venezuela. *Salus*, 11(Suppl 1): 27-31.
62. Hotez, P.J., E. Dumonteil, M.J. Heffernan, M.E. Bottazzi 2013. Innovation for the 'bottom 100 million': eliminating neglected tropical diseases in the Americas. *Hot Topics in Infection and Immunity in Children IX* (pp. 1-12).
63. Ibáñez-Cervantes, G., A. Martínez-Ibarra, B. Noguera-Torres, E. López-Orduña, A. L. Alonso, C. Perea, T. Maldonado, J.M. Hernandez, G. León-Avila, 2013. Identification by Q-PCR of *Trypanosoma cruzi* lineage and determination of blood meal sources in triatomine gut samples in Mexico. *Parasitology international*, 62: 36-43.
64. Kemmerling, U., C. Bosco, N. Galanti. 2010. Infection and invasion mechanisms of *Trypanosoma cruzi* in the congenital transmission of chagas' disease: a proposal, *Biological Research* vol. 43: 307–316
65. Kirchhoff, L.V., P. Paredes, A. Lomeli-Guerrero, M. Paredes-Espinoza, C.S. Ron-Guerrero, M. Delgado-Mejía, J.G. Peña-Muñoz. 2006. Transfusion-Formatted: Highlight associated Chagas disease (American trypanosomiasis) in Mexico: implications for transfusion medicine in the United States. *Transfusion*, 46:298-304.
66. Kollien, A.H., Schaub, G.A. 2000. The development of *Trypanosoma cruzi* in Triatominae. *Parasitology Today*. 16:381-387.
67. Kun, H., Moore, A., Mascola, L., Frank, S., Gena, L., Kubak, B., Suman R., Leiby D., Herron R., Mone T., Hunter R. y Kuehnert M. 2009. Transmission of *Trypanosoma cruzi* by heart transplantation. *Clinical infectious diseases*, 48(11), 1534-1540.
68. Levy, M.Z., Bowman N.M., Kawai V., Waller L., Cornejo J.G., Cordova E., Gilman R., Bern, C. 2006 Periurban *Trypanosoma cruzi* infected Triatoma infestans: Arequipa, Peru. *Emergent Infected Diseases* 12:1345–1352
69. Leiser, R., y Kaufmann P. 1994. Placental structure: in a comparative aspect. *Experimental Clinic Endocrinology*. 102:122–134
70. La Fuente, C., R. Urgel, C. Darras, E. Saucedo. 1985. Uso de tubos de microhematocrito para el diagnóstico rápido de la enfermedad de Chagas y malaria. *Annales De La Societe Belge De Medecine Tropicale* 65:95-99.
71. Llusía, J.B. 1992. Generalidades sobre la placenta. *La Placenta. Fisiología y Patología*, Editorial Días de Santos, Madrid, p 1-15.
72. López-Cancino, S.A., E. Tun-Ku, H.K. De la Cruz-Felix, C.N. Ibarra-Cerdeña, A. Izeta-Alberdi, A. Pech-May, C.J. Mazariegos-Hidalgo, A. Valdez-Tah, J.M. Ramsey. 2015. Landscape ecology of *Trypanosoma cruzi* in the southern Yucatan Peninsula. *Acta Tropica* 151: 58-72.

73. Luquetti, A.O., S.B.d. N. Tavares, L. d. R. Siriano, R.A. Oliveira, D.E. Campos, C.A. Morais, E.C. Oliveira. 2015. Congenital transmission of *Trypanosoma cruzi* in central Brazil. A study of 1,211 individuals born to infected mothers. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 110: 369-376.
74. Luquetti, A.O. 2007. Diagnóstico de la enfermedad de Chagas: Diagnóstico serológico, xenodiagnóstico, hemocultivo, reacción en cadena de la polimerasa y examen directo. En: *Enfermedad de Chagas*. Sociedad Colombiana de Cardiología y Cirugía Cardiovascular. 1ª Ed. Pag. 25-31.
75. Manrique-Abril, F., J. M. Ospina, G. Herrera, A. C. Florez, P. X. Pavia, M. Montilla, R. S. Nicholls, C. Puerta Bula, C. 2013. Diagnosis of Chagas disease in Pregnant Women and Newborns in Monquirá and Miraflores, Boyacá, Colombia. *Infectio* 17:28-34.
76. Marcili, A., V.C. Valente, S.A. Valente, A.C. Junqueira, F.M. da Silva, A. Y das Neves Pinto, R.D. Naiff, M. Campaner, J.R. Coura, E.P. Camargo, M.A. Miles. 2009. *Trypanosoma cruzi* in Brazilian Amazonia: Lineages TCI and TCIIa in wild primates, *Rhodnius* spp. and in humans with Chagas disease associated with oral transmission. *International Journal for Parasitology* 39: 615-623.
77. Martínez I, Noguera B, Martínez-Hernández F, Espinoza B. 2013. Microsatellite and Mini-Exon analysis of Mexican human DTU I *Trypanosoma cruzi* strains and their susceptibility to nifurtimox and benznidazole. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases* 13:181-187.
78. Milei, J., Scordo D., Basombrio M.A., Beigelman R., Storino R. 1989. Myocardial involvement in *Cavia porcellus* naturally infected with *Trypanosoma cruzi*. *Medicina (B. Aires)* 49:315–319 33.
79. Mess, A. 2007. The guinea pig placenta: model of placental growth dynamics. *Placenta*. 28:812– 815
80. Moncayo, A., Silveira, A. C. 2009. Current epidemiological trends for Chagas disease in Latin America and future challenges in epidemiology, surveillance and health policy. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 104(Suppl. 1), 17-30.
81. Monteón, V. M., López, R., Ramos-Ligonio, A., Acosta-Viana, K. 2014b. Transalidase Genes allow clustering of TcI *Trypanosoma cruzi* Mexican Isolates. *British Microbiology Research J* 4: 1299-1310
82. Monteón, V., Alducin, C., Hernández, J., Ramos-Ligonio, A., Lopez, R. 2013. High frequency of human blood in *Triatoma dimidiata* captured inside dwellings in a rural community in the Yucatan peninsula, Mexico, but low antibody seroprevalence and electrocardiographic findings compatible with Chagas disease in humans. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 88: 566-571.
83. Monteón, V., O. Triana-Chávez, A. Mejía-Jaramillo, P. Pennington, A. Ramos-Ligonio, K. Acosta, R. Lopez. 2014a. Circulation of Tc Ia discrete type unit *Trypanosoma cruzi* in Yucatan Mexico. *Journal of Parasitic Diseases*, 1-5

84. Moraes-Souza, H. 2000. Transmissão transfusional da doença de Chagas. *Revista do Patologia Tropical* 29: 91-100.
85. Moreno, E., A. Quintero, M. Alarcón, A. Lugo de Yarbuh, S.C. Moreno, S. Araujo, R. Borges. 2006. Investigaciones sobre la transmisión vertical de *Trypanosoma cruzi* en ratas Wistar crónicamente infectadas. *Boletín de Malariología y Salud Ambiental* 46:149- 160.
86. Moretti, E., B. Basso, I. Castro, M. C. Paez, M. Chaul, G. Barbieri, D. C. Feijoo, M.J. Sartori, R.C. Paez. 2005. Chagas disease: study of congenital transmission in cases of acute maternal infection. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 38: 53-55.
87. Moya, P., E. Basso, E. Moretti, 2005. Enfermedad de Chagas congénita: Aspectos epidemiológicos, clínicos, diagnósticos y terapéuticos: Experiencia de 30 años de seguimiento. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 38(Supl 2):33-40.
88. Nakagawa, J., J. Juárez, K. Nakatsuji, T. Akiyama, G. Hernández, R. Macal, C. Flores, M. Ortiz, L. Marroquín, T. Bamba and S. Wakai. 2005. Geographical characterization of the triatominae infestations in North-Central Guatemala. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, 99: 307-315.
89. Nargis, M., Chisty M., Ihama Y., Sato H., Inaba T., Kamiya H. 2001. Kinetics of *Trypanosoma cruzi* infection in guinea-pigs, with special reference to the involvement of epidermal Langerhans' cells in the induction of immunity. *Parasitology*. 123:373–380.
90. Nisida, I.V.V., Amato Neto V., Braz L. M.A., Duarte M. I. S., Umezawa E. S. 1999. A survey of congenital Chagas disease, carried out at three health institutions in Sao Paulo City, Brazil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* 41: 305-311.
91. Noireau, F.P. Diosique, A. Jansen. 2009. *Trypanosoma cruzi*: adaptation to its vectors and its hosts. *Veterinary Research* 40:26-27
92. Olivera Mar, A., F. Guillen Ortega, S. Cruz Vidal, N. Hernandez Becerril, E. Perez Galdamez, G. Cordova Concepcion, P.A. Reyes, V.M. Monteón. 2006. Serological and parasitological screening of *Trypanosoma cruzi* infection in mothers and newborns living in two chagasic areas of Mexico. *Archives of Medical Research* 37: 774-777
93. OMS, 2002. Control de la Enfermedad de Chagas. Segundo informe del Comité de Expertos de la OMS. Ginebra, p. 38.
94. OMS, 2016. La enfermedad de Chagas (tripanosomiasis americana) nota descriptiva No 340.
95. OPS, 2007. Plan de Acción para un enfoque integrado sobre la prevención y el control de las enfermedades crónicas. Washington, DC: OPS, 46.
96. OPS, 2013 Suministro de sangre para transfusiones en los países de Latinoamérica y del Caribe 2010 y 2011. Área de sistemas de salud basados en la atención primaria de salud Medicamentos y tecnologías Sanitarias.

97. Parada, H., Carrasco, H., Añez, N., Fuenmayor, I., Inglessis 1997. Cardiac involvement is a constant finding in acute Chagas disease: a clinical, parasitological and histopathological study. *International Journal of Cardiology* 60: 49-54.
98. Paricio-Talayero, J.M., Benlloch-Muncharaz, J.I., Collar-del-Castillo, A., RubioSoriano, C., Serrat-Pérez, J., Magraner-Egea, R., Igual-Adell. 2008. Vigilancia epidemiológica de la transmisión vertical de la enfermedad de Chagas en tres maternidades de la Comunidad Valenciana. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* 26: 609- 613.
99. Pereira, K.S., Schmidt, F.L., Guaraldo, A., Franco, R., Dias, V.L., Passos, L.A. 2009. Chagas' disease as a foodborne illness. *Journal of Food Protection* 72:441-446.
100. Pérez, G. S. M., Hernández, M. E., Rodríguez, A. C. 2011. La enfermedad de Chagas como un rezago social en salud. *Revista Cubana de Salud Pública*, 37: 159- 174.
101. Pérez Brandán C, Padilla AM, Diosque P, Basombrío MA. 2006. *Trypanosoma cruzi*: infectivity modulation of a clone after passages through different hosts. *Experimental Parasitology*. 114:89 –93
102. Pérez, M.C., Alarcón, M., Goncalves, L., Lugo de Yarbuh, E., Moreno, S., Araujo, J., Villarreal. 2008. Anomalías morfológicas y estructurales en fetos de ratones con infección aguda experimental por *Trypanosoma cruzi*. *Boletín de Malariología y Salud Ambiental* 47: 127-134.
103. Polonio, R., Ramirez-Sierra M.J. and Dumonteil E. 2009. Dynamics and distribution of house infestation by *Triatoma dimidiata* in central and Southern Belize. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 9: 19-24
104. Prata, A. 2001. Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease. *Lancet Infect Dis* 1:92-100. Raghupathy R, Kalinka J. 2008. Cytokine imbalance in pregnancy complications and its modulation. *Frontiers in Bioscience*. 13: 985-994.
105. Raghupathy R. 2001. Pregnancy: success and failure within the Th1/ Th2/Th3 paradigm. *Seminars in Immunology* 13: 219-227.
106. Ramos-Echevarría, A., Monteón-Padilla, V., Reyes-López, P. 1992. Detección de anticuerpos contra *Trypanosoma cruzi* en donadores de sangre. *Salud Pública de México*. 35:56-63.
107. Ramos-Ligonio A, Torres-Montero J, Lóez-Monteón A, Dumonteil E. 2012. Extensive diversity of *Trypanosoma cruzi* discrete typing units circulating in *Triatoma dimidiata* from central Veracruz, Mexico. *Infection, Genetics and Evolution* 12:1341-1343.
108. Ramsey, J.M., Alvarez, E., Chávez, V., Danis, R., Rojo, J. 2000. Seroprevalence and risk factors associated with *Trypanosoma cruzi* infection in blood donors from the General Hospital, México City. En: XVth International Congress for Tropical Medicine and Malaria. 25-28; Cartagena, Colombia.

109. Reyes, P.A., Monteón, V.M., Hernández-Becerril, N. 1999. The risk of transfusion transmission of Chagas disease in Mexico City. *Transfusión*. 40:613-17.
110. Rojo, J., Bonifaz, R., Vargas, S., Zarazúa, P., Cabrera, M., Salazar-Schettino, P.M. 1999. Seropositividad para enfermedad de Chagas en donantes de sangre del Hospital General de México. En: *Memorias del Congreso Iberoamericano de Medicina Transfusional*; nov 4-6; Colima (Colima), Mexico.
111. Rosa, R., Y. Basmadján, M. González Murguiondo, M. González Arias, R. Salvatella, 2001. Actualización clínico-epidemiológica y terapéutica de la enfermedad de Chagas en Uruguay. *Revista Médica del Uruguay* 17: 125-132.
112. Sala M., Lopes R., Carraro A., Meneguette C. 2006. Efecto de La infección aguda por diferentes cepas de *Trypanosoma cruzi* sobre el crecimiento intrauterino de fetos de ratón. *Parasitología Latinoamericana* 61: 69-73.
113. Salas-Clavijo, N.A., J.R. Postigo, D. Schneider, J.A. Santalla, L. Brutus, J.P. Chippaux. 2012. Prevalence of Chagas disease in pregnant women and incidence of congenital transmission in Santa Cruz de la Sierra, Bolivia. *Acta Tropica*, 124: 87–91
114. Salazar Schettino PM, Bucio Torres M, Cabrera Bravo M, Ruiz Hernández AL. 2011. Chagas disease in Mexico. Report of two acute cases. *Gaceta Médica de México*. 147:63- 69.
115. Salazar-Schettino, M. P. 2010 A revision of thirteen species of Triatominae (Hemiptera: Reduviidae) vectors of Chagas disease in Mexico. *Journal of the Selva Andina Research Society* 1: 57-80.
116. Salazar-Schettino, P., G. Rojas, M. Buccio, M. Cabrera, G. Garcia, Y. Guevara, R. Tapia. 2007. Seroprevalence of *Trypanosoma cruzi* antibodies and associated risk factors among the population under 18 years of age in Veracruz, Mexico. *Revista Panamericana de Salud Pública* 22: 75-82.
117. Sanmartino, M., L Crocco. 2000. Conocimientos sobre la enfermedad de Chagas y factores de riesgo en comunidades epidemiológicamente diferentes de Argentina. *Pan American Journal of Public Health*. 7:173-178.
118. Schijman, A.G., Bisio, M., Orellana, L., Sued, M., Duffy, T., Jaramillo, A. M. M., Deborggraeve, S. 2011. International study to evaluate PCR methods for detection of *Trypanosoma cruzi* DNA in blood samples from Chagas disease patients. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 5(1), e931.
119. Schmunis, G. A. 2007. Epidemiology of Chagas disease in non endemic countries: the role of international migration. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 102, 75-86.
120. Shender L.A., Lewis M.D., Rejmanek D., Mazet J.A. 2016. Molecular Diversity of *Trypanosoma cruzi* detected in the vector *Triatoma protracta* from California, USA. *PLOS Neglected Tropical Diseases* 10(1):e0004291.

121. Shippey, S.H., C.M. Zahn, M.M. Cisar, T.J. Wu, A.J. Satin. 2005. Use of the placental perfusion model to evaluate transplacental passage of *Trypanosoma cruzi*. American Journal of Obstetrics and Gynecology 192: 586-591.
122. Solís, H., E. De Carvalho, C. Ferreira, C. Casanova, A. Huamán, V Mendoza. 2003. Contribución al estudio de la epidemiología de la enfermedad de Chagas en Formatted: Font: Not Italic, Highlight tres localidades de la zona sur del Perú. Anales de la Facultad de Medicina 64: 223-227.
123. Solórzano-Santos, F. 2008. Enfermedad de Chagas en el siglo XXI: Un panorama histórico. Boletín Médico del Hospital Infantil de México 65:03-05.
124. Sosa-Estani, S., Dri, L., Touris, C., Abalde, S., Dell'Arciprete, A., Braunstein, J. (2009). Transmisión vectorial y congénita del *Trypanosoma cruzi* en Las Lomitas, Formosa. *Medicina* (Buenos Aires), 69(4), 424-430.
125. Tibayrenc, M., P. Ward, A. Moya, F.J. Ayala. 1986. Natural populations of *Trypanosoma cruzi*, the agent of Chagas disease, have a complex multiclonal structure. Proceedings of the National Academy of Sciences 83: 115-119.
126. Toso, A., Vial, F., Galanti, N. (2011). Transmisión de la enfermedad de Chagas por vía oral. *Revista médica de Chile*, 139(2), 258-266
127. Vela-Bahena, L.E., Raymundo-Vergara, L., Celso R. 2015. Tratamiento posparto en una paciente con enfermedad de Chagas, sin interrupción de la lactancia. *Revista Ginecología y Obstetricia de México* 83:487-493.
128. Viotti, R., Vigliano, C., Lococo, B., Alvarez, M.G., Petti, M., Bertocchi, G., Armenti, A. 2009. Side effects of benznidazole as treatment in chronic Chagas disease: fears and realities. *Expert Review of Anti-Infective Therapy* 7(2):157-63.
129. Yáñez del Solar, E.D. 2011. Estudio de las alteraciones tisulares en placentas de madres con enfermedad de Chagas crónica asintomática. Tesis licenciatura. Universidad de Chile. 12-20
130. Zingales, B., M.A. Miles, D.A. Campbell, M. Tibayrenc, A.M. Macedo, M.M. Teixeira, A.G. Schijman, M.S. Llewellyn, C. Machado, S.G. Andrade, N.R. Sturm. 2012. The revised *Trypanosoma cruzi* subspecific nomenclature: rationale, epidemiological relevance and research applications. *Infection, Genetics and Evolution* 12:240- 253.
131. Zingales, B., S.G Andrade, M.R. Briones, D.A. Campbell, E. Chiari, O. Fernandes, F. Guhl, E. Lages-Silva, A.M. Macedo, C.R. Machado, M.A. Miles, A.J. Romanha, N.R. Sturm, M. Tibayrenc, A.G. Schijman. 2009. A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*; 104:1051-1054.

**ARTICULO (ORIGINAL RESEARCH) ELABORADO DE ACUERDO AL
FORMATO DE LA REVISTA PLOS Neglected Tropical Diseases**

**Quantitative and histological assessment of maternofetal transmission of
Trypanosoma cruzi in guinea pigs: an experimental model of congenital
Chagas disease**

Jatziri Torres-Vargas ¹, Matilde Jiménez-Coello ², Eugenia Guzmán-Marín², Karla Y. Acosta-Viana ², Zaida E. Yadon ³, Eduardo. Gutiérrez-Blanco ¹, José Leonardo Guillermo Cordero ¹, Nisha J. Garg ^{4,*}, Antonio Ortega-Pacheco ^{1,*}

¹ Unidad de Enseñanza Médica, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma de Yucatán, Mérida, Yucatán, México.

² Laboratorio de Biología Celular, Centro de Investigaciones Regionales "Dr. Hideyo Noguchi", Universidad Autónoma de Yucatán, Mérida, Yucatán, México.

³ Health Surveillance, Disease Prevention and Control, Pan American Health Organization, Washington, DC 20037-2895.

⁴ Department of Microbiology & Immunology, University of Texas Medical Branch, Galveston, TX 77555-1070.

*Corresponding authors

Dr. Antonio Ortega-Pacheco, Unidad de Enseñanza Médica, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma de Yucatán, Mérida, Yucatán, México. E-mail:
Key words: Congenital transmission, guinea pig, *T. cruzi*, DTU I, parasite load, cardiomyopathy, Chagas disease

ABSTRACT

Objective: We evaluated the effect of *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*) infection on fertility, gestation outcome, and materno-fetal transmission in guinea pigs (*Cavia porcellus*).

Methods: Animals were infected with *T. cruzi* H4 strain (Tcl lineage) before gestation (IBG) or during gestation (IDG). Tissue and sera samples of dams and fetuses were obtained near parturition.

Results: All IBG and IDG dams were seropositive by two tests, and exhibited blood parasite load of 1.62 ± 2.2 and 50.1 ± 62 parasites/ μ L, respectively, by quantitative PCR (PCRq). Histological evaluation showed muscle fiber degeneration and cellular necrosis in all infected dams. Parasite nests were not detected; however, qPCR detected 153 ± 104.7 and 169.3 ± 129.4 parasites-eq/g in the heart of IBG and IDG dams, respectively. All fetuses of infected dams were positive for anti-parasite IgG antibodies and tissue parasites by qPCR, but presented a low level of tissue inflammatory infiltrate. Fetuses of IDG (vs. IBG) dams exhibited higher degree of muscle fiber degeneration and cellular necrosis in the heart and skeletal tissues. The placental tissue exhibited no inflammatory lesions and amastigote nests, yet parasites-eq/g of 381.2 ± 34.3 and 79.2 ± 84.9 were detected in IDG and IBG placentas, respectively. Fetal development was compromised, and evidenced by a decline in weight, crown-rump length, and abdominal width in both groups.

Conclusions: *T. cruzi* Tcl has a high capacity of congenital transmission even when it was inoculated at a very low dose before or during gestation. Tissue lesions, parasite load, and fetal under development provide evidence for high virulence of the parasite during pregnancy. Despite high parasite burden by qPCR, placentas were protected from cellular damage. Our studies offer an experimental model to study the efficacy of vaccines and drugs against congenital transmission of *T. cruzi*. These results also call for *T. cruzi* screening in pregnant women and adequate follow up of the newborns in endemic areas.

INTRODUCTION

American trypanosomiasis, also known as Chagas disease, is caused by a flagellate protozoan *T. cruzi*. The clinical course of Chagas disease is divided into the acute and chronic phases. The acute infection is presented with blood parasitemia and is often mildly symptomatic. Infected individuals then evolve into chronic phase. While many remain in an indeterminate phase without any clinical symptoms, ~30% progress to develop clinically relevant Chagas disease. Chronic chagasic cardiomyopathy is a complex disease that includes a wide-spectrum of manifestations, ranging from minor myocardium involvement to left ventricular (LV) systolic dysfunction, dilated cardiomyopathy, arrhythmias, thromboembolic events, and terminal cardiac failure (Ribeiro et al., 2013). Gastrointestinal (GI) manifestations, such as mega-syndromes involving tubular structures of the GI tract, though not commonly recorded, are frequent in certain geographic areas (Florez et al., 2010).

The vectorial transmission of the parasite by hematophagous triatomines (kissing bugs) is the most commonly recognized route of infection in endemic areas (Solórzano-Santos, 2008), though other routes of infection including transfusion of contaminated blood (Cardoso et al., 2012) and transplantation of infected organs (Luquetti et al., 2015) have also been noted. However, congenital transmission (CT) of *T. cruzi* is also an important public health problem. Though underestimated and underreported, recent estimates indicate that congenital transmission of *T. cruzi* occurs at a rate of 1-12% in endemic Latin American countries (Carlier and Torrico, 2003). If left untreated, neonates may develop cardiac or enteric disease at delivery or weeks' later (Pehrson et al., 1981). Severity of the disease in infected children varies greatly from mild symptomatic cases to fatal cases (Yadon and Schmunis, 2009). Several factors can be involved in CT of *T. cruzi* and disease development; among them the genetic variability of

the parasite may have considerable effect (Blanco et al., 2000; Cardoso et al., 2012).

The CT of *T. cruzi* can occur at any time during gestation (Guzmán-Bracho et al., 1998; Yves and Truyenes, 2015), though some investigators have suggested that maximal likelihood of congenital infection occurs during the third trimester of gestation (Carlier and Torrico, 2015) when the placenta undergoes a series of physiological and metabolic transformations that favor the invasion of infectious agents (Desai et al., 2007). Trophoblastic detachment (Fretes and Kemmerling, 2012) and apoptosis (Duaso et al., 2011) with disorganization of basal lamina and collagen destruction (Duaso et al., 2010) in placenta of woman with chronic Chagas disease is documented (Duaso et al., 2012). Studies of CT of *T. cruzi* in rats and mice demonstrated the presence of parasite in the gravid uterus and amniotic fluid (Carlier and Torrico, 2003).

Guinea pigs (*Cavia porcellus*) are an important natural reservoir host for *T. cruzi*, and mimic reproducible and comparable human phases of acute infection and chronic disease (Kemmerling et al., 2010; Castro-Sesquen et al., 2011). Importantly, guinea pig shares several anatomical aspects with the placenta of humans since there is an extensive invasion of the trophoblast (hemo-monocortical placentation). Because of their longer time of gestation compared with other murine models and a potentially higher surface of contact of the pathogen with the placenta, guinea pigs offer an excellent model for the study of congenital transmission of *T. cruzi* infection.

In this study, our main goal was to establish the experimental guinea pig model of congenital transmission of *T. cruzi*. We also measured the effect of *T. cruzi* exposure at various stages of gestation on fertility, pregnancy outcome, and heart and colon pathology in mother and pups. We discuss the potential utility of guinea pig model in screening new drugs and vaccines against CT of *T. cruzi*.

MATERIALS AND METHODS

Animals, parasites, and infection

All animal experiments were performed according to the National Institutes of Health Guide for Care and use of Experimental Animals, and approved by the bioethics committee from the Campus of Biological and Agricultural Sciences from the Autonomous University of Yucatan (No. CB-CCBA-M-2016-001). The maintenance of the animals was performed under the current official Mexican standards (NOM-062-ZOO-1999) "Technical specifications for the production, care and use of laboratory animals".

Female guinea pigs (*Cavia porcellus*) weighing 650 ± 50 g (4-5 months old) were purchased from The Mexican Center for Research and Advanced Studies of the National Polytechnic Institute (CINVESTAV), and confirmed seronegative for *T. cruzi* by two tests before use in this study. Animals were kept in individual cages under controlled conditions of temperature, humidity and light cycles according to the requirements of the species, with food and water *ad libitum*. Pregnancy was diagnosed by day 25 post-mating using an ultrasound with a micro-convex 7.5 MHz transducer.

T. cruzi H4 strain of TcI lineage (Martínez et al., 2013) has been maintained in ICR mice by monthly passages. Three study groups were established with five female guinea pigs per group. Animals were inoculated with 100 trypomastigotes of H4 strain intraperitoneal (IP) route obtained from previously infected mice. Female guinea pigs in group-A were infected, and 30 days later mated with males. Infection before gestation (IBG) was performed to study CT in indeterminate phase of infection. Animals in group-B were mated, and at mid-term of pregnancy (i.e., 30 ± 3 days of gestation), infected with *T. cruzi*. Infection during gestation (IDG) was performed to study the effect of acute infection during pregnancy on CT. Animals in Group C were mated but not infected, and used as a control group. Line diagram of infection and mating schedule is presented in Fig.1A.

Sampling

Animals from all groups were euthanized at the end of the pregnancy according to the official Mexican standards (NOM-033-SAG/ZOO-2014), "Methods for killing domestic and wild animals". The prolificacy (total number of fetuses obtained by each female per gestation) and the size and weight of fetuses were recorded. Likewise, macroscopic alterations in fetuses indicating the location and severity of damage were recorded. Fetal tissue sections (heart, liver, skeletal muscle, and spleen) were fixed in 10% buffered formalin for histology and stored at -20°C for DNA purification. Blood samples were taken from the dams and fetuses for collecting the serum and frozen at -20°C until analysis. Blood samples from dams were also taken for DNA extraction. Heart tissue was also collected from dams for histological examination

Serology

Sera samples were monitored for *T. cruzi*-specific IgG antibody response by an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) by using a Wiener Chagatest-ELISA recombinant v.4.0 kit. The kit detects antibody response to six recombinant proteins that are expressed in *T. cruzi*. The assay was carried out following the manufacturer's recommendations, except that 2nd antibody was replaced with goat anti-guinea pig IgG conjugated with HRP (sc2903, Santa Cruz Biotechnology, Dallas TX). Briefly, 96-well plates were coated with recombinant proteins, and then sequentially incubated with 20- μ l sera samples (1:100 dilution) and HRP-conjugated guinea pig anti-IgG (1: 5000 dilution) diluted in phosphate buffer (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 4.3 mM Na₂HPO₄, and 1.4 mM KH₂PO₄, pH 7.4). Color was developed with tetramethylbenzidine and hydrogen peroxide substrates, and reaction was stopped by acidification of the reaction medium. The optical density was recorded at 450 nm by using an xMark™ microplate absorbance spectrophotometer (Bio-rad, Hercules, CA). The cut-off was determined from the mean value of the negative control sera samples \pm 3 standard deviations (Cannova et al., 2002). The sensitivity and specificity of the test was recorded at

99% and 98.3%, respectively. Western blotting (WB) and Indirect Immunofluorescence assay (IFA) described previously (Jimenez-Coello et al., 2008) were employed to confirm the seropositive samples.

DNA extraction

The DNeasy Blood and Tissue Kit (69504, Qiagen, Germantown MD) was used to isolate the genomic DNA of the blood and tissue samples by following the manufacturers' instructions. Total DNA was examined for quality (OD₂₆₀/OD₂₈₀ ratio of 1.7-2.0) and quantity ($[(OD_{260} - OD_{320}) \times 50\text{-}\mu\text{g/ml}]$) by using a DU[®] 800 UV/visible spectrophotometer. All samples were evaluated by quantitative PCR (qPCR) for glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene (GAPDH) to demonstrate absence of any kind of inhibitors in the reaction mix and to establish equal amounts of DNA is used for all reactions (Wali et al., 2014).

Quantitation of parasite burden

Total DNA (25 ng) was used as template in a qPCR to estimate the parasite load in the samples. The qPCR was performed with SsoAdvanced Universal SYBR Green Supermix (172-5271, Bio-rad) and *T. cruzi* nuclear satellite DNA oligonucleotides (TCZ-F 5'-GATCTTGCCCACAMGGGTGC-3' and TCZ-R 5'-CAAAGCAGCGGATAGTTCAGG-3') as previously described (Schijman et al., 2011).

Standard curve was prepared by using epimastigotes of *T. cruzi*, clone CL Brener, TcVI as described (Bua et al., 2012). Briefly, 200 μl of blood from a seronegative *C. porcellus* was spiked with 10^7 parasites/ml, and total DNA was extracted. Ten-fold dilutions of the extracted DNA, corresponding to 10^6 - 0.1 parasite/ml, were used in qPCR, as above. Likewise, different standard curves were prepared for evaluation of parasites in placental, heart, skeletal muscle, and spleen tissues. Total DNA extracted from blood and tissues of uninfected guinea pigs were used as negative controls. All samples were tested in triplicate, and

parasite standard curve, negative controls, and no-template DNA control were included in all qPCR experiments. The data are presented as parasite equivalent/mL blood or parasite equivalent/gr tissue, respectively.

Histology

Heart and skeletal tissue sections of female guinea pigs and fetal tissue samples (utero-placental unit, heart and skeletal muscle) were fixed in 10% buffered formalin for 24 hours, dehydrated in absolute ethanol, cleared in xylene, and embedded in paraffin. Five-micron tissue sections were mounted on glass slides, deparaffinized, and subjected to hematoxylin and eosin (H&E) staining. In general, we analyzed each tissue-section for >10-microscopic fields (100X magnification), and examined three different tissue sections/organ/animal to obtain a semi-quantitative score. Presence of inflammatory cells in H&E stained sections was scored as 0 (absent), 1 (focal or mild, 0-1 foci), 2 (moderate, ≥ 2 foci), 3 (extensive inflammatory foci, minimal necrosis, and retention of tissue integrity), and 4 (diffused inflammation with severe tissue necrosis, interstitial edema, and loss of integrity). Inflammatory infiltrates were characterized as diffuse or focal depending upon how closely the inflammatory cells were associated.

Statistical analysis

All experiments were conducted at least twice (n=5 guinea pigs/group/experiment), and all samples were analyzed in triplicate. Data are expressed as mean \pm standard deviation (SD). Comparisons of means between and within groups were performed using the Student's t test and ANOVA, considering a significance of 95% (i.e., $p < 0.05$). The CT was considered when amastigote nests or *T. cruzi* DNA were detected in any of the fetal tissues and histological lesions were observed.

RESULTS

All dams in IBG and IDG groups were seropositive for *T. cruzi*-specific antibodies at the end of the study. The sera levels of IgG antibodies, monitored by an ELISA (Fig.1B) and Western blotting (Fig.1C) were similar in dams of both infected groups. Infection by *T. cruzi* was also confirmed by qPCR detection of blood parasites and heart tissue parasites. Dams in IBG group exhibited low but detectable blood parasites, and a high variation in the blood parasitic load was observed in dams of the IDG group (Fig.1D). Yet, dams of IDG group exhibited >40-fold higher level of blood parasitemia that was statistically significant ($p < 0.05$) when compared to that detected in IBG dams (Fig.1D). Heart tissue parasites were detected at similar level in all dams of both groups (Fig.1E). These results suggest that a) *T. cruzi* H4 isolate is virulent, and replicates and disseminates to tissues in guinea pigs, b) acute phase parasitemia is presented by IDG dams, and c) indeterminate phase of infection is presented in IBG guinea pigs. All infected dams showed an inflammatory infiltrate with cellular necrosis and fiber degeneration in the heart tissue without the presence of *T. cruzi* amastigote nests.

Several mating attempts were needed get the IBG and IDG dams pregnant, while all control females became pregnant in first attempt. Once pregnant, no statistically significant differences were observed in the number of fetuses carried by females in different groups. The average number of fetuses carried by IBG and IDG females was 2.8 ± 0.8 and 3.0 ± 0.0 respectively, and comparable to that noted in control group (Fig.2A). However, significant differences were observed in the overall growth of the fetuses of the IBG and IDG females when compared to the control group. Fetuses carried by IBG (vs. control) females were 26%, 14%, and 15% lower in weight, length, and width, respectively (all, $p < 0.05$), while fetuses carried by IDG (vs. control) females were 11% and 15% less in weight and width ($p < 0.05$), and 13% lower in length ($p > 0.05$) (Fig.1B-D). These results

suggest that *T. cruzi* infection of dams before or during gestation results in decreased frequency of pregnancy and decreased growth of the fetuses.

Next, we determined if differences in fetal size correlates with congenital transmission of *T. cruzi*. All sampled fetuses were seropositive for *T. cruzi*-specific IgG antibodies by an ELISA (Fig.3A) and IFA (Fig.3B). No amastigote nests were detectable by histological analysis of tissue sections (heart, placenta and skeletal muscle) of fetuses carried by dams in IBG and IDG groups. A quantitative measure of tissue parasite load in fetuses was obtained by qPCR. The qPCR data showed that all fetuses carried by dams in IBG and IDG groups were infected. Tissue parasite load in fetal tissues of IBG and IDG groups was observed in the order of skeletal muscle > heart > spleen > liver. Parasite load in fetal heart, spleen and skeletal tissue did not show statistical differences between IBG or IDG groups. However, placental parasite burden in fetuses of IDG dams was 4-fold higher than that observed in placental tissue of IBG dams (Fig.3C). Together, these results suggest that maternal-fetal transmission of *T. cruzi* occurred at high rate in guinea pigs exposed to the parasite before or during gestation. Exposure during gestation poses higher risk of congenital transmission because of high parasitemia in placental tissue.

Finally, fetal tissues were evaluated by histology for *T. cruzi* induced inflammation and tissue damage. Representative images of H&E stained tissue sections (heart, skeletal muscle and placenta) are presented in Fig.4. Frequency and severity of lesions in different tissues of fetuses from both infected groups compared with the control group is presented in Table 1. The most common lesions in the tissues of the fetuses were cell necrosis and degeneration of fibers, and these were more frequently presented in fetuses carried by females in IDG group than in IBG group. This was evidenced by the finding that fiber degeneration and cellular necrosis in the heart and skeletal muscle were noted in 50-66% of the fetuses in IDG group and 25-58% of the fetuses in IBG group, respectively (Fig.4 and Table 1). In comparison, inflammatory infiltrate was presented in fewer pups. More pups carried by IBG females (up to 25%) than the pups carried by IDG

females (up to 16%) exhibited cardiac and skeletal muscle infiltration of inflammatory infiltrate. However, the extent of tissue inflammatory infiltrate was more pronounced in cardiac tissue of fetuses carried by IDG females (score: 2) than was noted in fetuses of IBG dams (score 1). A low degree of inflammatory infiltrate (score 1) was noted in skeletal tissue of all fetuses in IDG and IBG groups. The placentas, even in the IDG group where significant parasite loads were observed (381 ± 34.30 par eq/gr), exhibited no lesions associated with *T. cruzi*. Only structural changes presented by dystrophic calcification that are commonly observed in advanced gestation were seen in all fetal-placental tissues of uninfected as well as infected dams. These results suggest that all fetuses carried by infected dams are at risk of *T. cruzi* infection. The extent of fetal tissue damage is more pronounced depending on the parasitemia status and to a lesser extent caused by the infiltration of inflammatory infiltrate. The placental tissues, despite the presence of high degree of parasite burden, are protected from infection induced cellular damage.

DISCUSSION

Results of the present study demonstrate the high capacity of congenital transmission of *T. cruzi* strain H4 (DTU I) in a guinea pig model even when using a low dose of inoculum. Guinea pigs (like humans), have a deep invasion of the trophoblast into the maternal decidua, which is limited in most other rodent models (Kaufman et al., 2003); and guinea pigs mimic the human pregnancy by the progesterone profile; progesterone is produced in the placenta by the end of gestation that does not decline at term (Mitchell and Taggart, 2009) contrary to what happens in most rodents and other mammals. Further, the long gestation period of 72 days provides an opportunity to study the effect of parasite replication in dams during gestation on fetal development. Thus, guinea pigs offer a best available model for studying the human congenital infection.

Cencig et al, (2013) observed a very low rate of congenital infection, occurring in approximately 4% of living pups born to acutely infected mice. In another study, Wistar rats acutely infected with *T. cruzi* (DTU II) also exhibited a very low rate of parasite congenital transmission though a substantial decline in weight and an increase in acute myocarditis was noted in the pups that were congenitally infected (Moreno et al., 2003). Mjihdi et al (2002) observed infertility and fetal death in mice infected with a *T. cruzi* DTU I strain. The authors noted a massive invasion of the decidua, ischemic necrosis of placental tissue, poor fetal growth, and significant fetal losses in mice; however, no evidence of congenital transmission in fetuses was noted. Likewise, Sala et al, (2006), evaluating a high dose of *T. cruzi* strain Y in pregnant mice, observed a decline in fetal weight and length, placental weight and umbilical cord length, but no or low frequency of infection of the fetus. Altogether, these studies indicate that fetal loss and a decline in fetal growth in mice occurs due to placental infection and infection induced pathologies in the placental tissue. Mice did not provide a true indication of congenital infection of pups. Our guinea pig model captured all the benefits that can be useful in studying the efficacy of therapies against congenital transmission. One, all guinea pig dams, irrespective of their exposure to infection before or during gestation, carried fetuses that were congenitally infected by *T. cruzi*, and these fetuses also exhibited growth retardation and histological lesions in placental, cardiac and skeletal tissues. Two, with inoculation of low dose of parasite, all dams still became infected, and a decline in number of fetuses carried by infected (vs. normal) dams, still-birth, or fetal reabsorption was not observed at a significant level. Thus, it was feasible to obtain power for analyzing the effect of congenital infection in small number of guinea pig dams. Three, all fetuses of infected dams were serologically positive indicating the transplacental transfer of maternal antibodies and functionality and transfer capacity of the placenta in guinea pigs (Troyens et al., 2005). Thus, we surmise that guinea pigs provide a true model of maternal-fetal transmission of *T. cruzi* and Chagas disease, and also offer opportunity for efficacy testing of therapies to prevent fetal infection.

There is a high correlation between the crown-rump length of the embryo and its heart rate (Van Heeswijk et al., 2013). In humans, when first trimester embryos develop a low heart rate, there is a dismal prognosis of pregnancy resulting from embryo underdevelopment (Benson et al., 1994). Alterations in the blood flow may be associated with the growth and development of embryos (Branum et al., 2013). *T. cruzi* TcI is able to produce high parasitemia rates and because of their high tropism to cardiac tissue during the acute and chronic phases of the disease can lead to myocarditis, lymphocyte and monocytes infiltrations and production of amastigote nests (Cruz et al., 2015). In the present study a high tropism towards cardiac tissue of the dams and damage of the cardiac tissue of fetuses was seen where the parasites probably replicated leading to impaired function and affecting the embryo viability and growth.

Placenta is the key fetal organ in charge of protecting the fetus from any infectious pathogen (Carlier and Truyens, 2015). Congenital transmission of *T. cruzi* is suggested to occur when the phagocytic capacity of the placenta is blocked (Delgado and Santos-Buch, 1978) and a significant amount of blood parasites are present in the infected dam (Siriano et al., 2011). In our model, we did not detect evidence of placental damage in the infected dams, and we also did not see a strong correlation between the qPCR detection of parasites in blood or placental tissue to transmission of parasite to fetuses. Thus, the route of transmission to the embryos is not clearly established. We suspect that due to the low dose of the parasite used, the placental response and rearrangement was not produced, and hematogenous trans-placental transmission occurred silently. Another probable route of fetal infection is through the invasion of marginal zones of the placenta, which is devoid of trophoblasts, and thus allows the passage of parasites especially during a moderate parasitemia. A trans-uterine route of transmission has also been suggested (Carlier and Truyens, 2015), but it is less probable and difficult to probe.

Parasite is primarily detected in the heart during the chronic phase of the disease (Ben Younes-Chennoufi et al., 1988). However, tropism of *T. cruzi* is not exclusive to cardiac tissue. Other organs such as kidney, lung, pancreas,

gastrointestinal tissue, skeletal muscle, spleen, and liver etc. are normally infected during experimental acute infection in mouse models (Guarner et al., 2001). Our finding of *T. cruzi* in multiple fetal organs suggests that pups develop an acute-like infection after exposure to the parasite from mother. It is likely that parasite replication occurs in the placenta, and when infected placental cells release the trypomastigotes, the parasite reaches fetus through the trophoblast or aspiration of amniotic fluid by the fetuses, and then spreads by active penetration through skin, mucosal membranes or organ-to-organ dispersion (Alarcon et al., 2006; Pérez et al., 2008). The degree of invasion to fetal tissues and disease severity may also depend on the virulence and dose of the strain of *T. cruzi* involved (Alarcon et al., 2009; Alkmim-Oliveira et al., 2013; Borges et al., 2013). In the present study, a very low dose (100 parasites) of a high virulent strain of *T. cruzi* was able to invade diverse tissues of the fetuses during the congenital transmission.

We have demonstrated a guinea pig model of *T. cruzi* infection and maternal-fetal transmission. Even in low dose of *T. cruzi* DTU I was sufficient to establish high rate of congenital transmission to fetuses. The frequency of transmission to fetuses was high irrespective of whether the mother was exposed to infection before or during gestation, though the extent of fetal tissue damage tended to be higher when dams were exposed to parasite during gestation. Guinea pigs share several anatomical aspects with the human placenta and have a longer gestation than other rodent models, and thus offer an excellent model for the study of congenital transmission of the diverse lineages of *T. cruzi*. Our findings also call for *T. cruzi* screening in pregnant women and adequate follow up of the newborns in endemic areas.

REFERENCES

1. Alarcón M., Lugo de Yarbuh A., Moreno, E., Payares, G., Araujo, S., Colmenares, M. (2006) Presencia de *Trypanosoma cruzi* en tejidos de ratas Wistar infectadas experimentalmente y sus fetos. Bol. Malariol. Salud. Amb 46: 137-148.
2. Alarcón M., Pérez M.C., Villarreal J., Araujo S., Goncalves L., González A., Moreno E., Lugo-Yarbuh A. (2009) Detection of *Trypanosoma cruzi* DNA in the placenta and fetuses of mice with Chagasic acute infection. Invest Clin. 50:335-345.
3. Alkmim-Oliveira S.M., Costa-Martins, A.G., Kappel, H.B., Correia, D., Ramirez, L.E. y Lages-Silva, E. (2013) *Trypanosoma cruzi* experimental congenital transmission associated with TcV and TcI subpatent maternal parasitemia. Parasitology research, 112: 671-678.
4. Benson C.B., Doubilet P.M. (1994) Slow embryonic heart rate in early first trimester: indicator of poor pregnancy outcome. Radiology. 192:343-344.
5. Ben Younes-Chennoufi A., Hontebeyrie-Joskowicz M., Tricottet V., Eisen H., Reynes M., Said G. (1988) Persistence of *Trypanosoma cruzi* antigens in the inflammatory lesions of chronically infected mice. Trans R Soc Trop Med Hyg. 82:77-83.
6. Blanco S.B., Segura, E.L., Cura, E.N., Chuit, R., Tulián, L., Flores, I., Garbarino G., Villalonga, J.F., Gürtler, R.E. (2000) Congenital transmission of *Trypanosoma cruzi*: an operational outline for detecting and treating infected infants in north-western Argentina. Trop Med Int Health, 5: 293-301.
7. Borges D.C., Araújo N.M., Cardoso C.R., Lazo-Chica J.E. (2013) Different parasite inocula determine the modulation of the immune response and outcome of experimental *Trypanosoma cruzi* infection. Immunol 138:145-156.
8. Branum S.R., Yamada-Fisher M., Burggren W. (2013) Reduced heart rate and cardiac output differentially affect angiogenesis, growth, and development in early chicken embryos (*Gallus domesticus*). Physiol Biochem Zool. 86: 370-382.
9. Bua J., Volta B.J., Velazquez E.B., Ruiz A.M., Rissio A.M.D., Cardoni R.L. (2012). Vertical transmission of *Trypanosoma cruzi* infection: quantification

- of parasite burden in mothers and their children by parasite DNA amplification. *Trans Royal Soc Trop Med Hygiene*, 106: 623-628.
10. Cannova D.C., Aguilar C.M., Pacheco M., Simona M.I., Medina M. (2002) Validación del inmunoensayo enzimático (ELISA) y hemoaglutinación indirecta (HAI) para el serodiagnóstico de la enfermedad de Chagas. *Salus* 6:4-9
 11. Cardoso E.J., Valdéz, G.C., Campos, A.C, Sanchez, R.D., Mendoza, C.R., Hernández, A. P., Ramírez, M.H., Habana, J.R., González, E.B., Matzumura, P.D., Carlier, Y. (2012) Maternal fetal transmission of *Trypanosoma cruzi*: A problem of public health little studied in Mexico. *Exp. Parasitol.* 13: 425-432.
 12. Carlier Y., Torrico, F. (2003) Congenital infection with *Trypanosoma cruzi*: from mechanisms of transmission to strategies for diagnosis and control. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 36:767-771.
 13. Carlier Y., Truyenes C. (2015) Congenital Chagas disease as an ecological model of interactions between *Trypanosoma cruzi* parasites, pregnant women, placenta and fetuses. *Acta Trop.* 151: 103-115.
 14. Castro-Sesquen Y.E., Gilman R.H., Yauri V., Angulo N., Verastegui M., Velasquez D.E., Sterling C.R., Martin D., Bem C. (2011) *Cavia porcellus* as a model for experimental infection by *Trypanosoma cruzi*. *The American Journal of Pathology.* 179: 281-288.
 15. Cencig S, Coltel N, Truyens C, Carlier Y. (2013) Fertility, gestation outcome and parasite congenital transmissibility in mice infected with TcI, TcII and TcVI genotypes of *Trypanosoma cruzi*. *PLoS Negl Trop Dis.* 7(6):e2271.
 16. Cruz L., Vivas A., Montilla M., Hernandez C., Florez C., Parra E., Ramirez J.D. (2015) Comparative study of the biological properties of *Trypanosoma cruzi* I genotypes in a murine experimental model. *Infect Genet Evol.* 29:110-117.
 17. Delgado, M.A., Santos-Buch, C.A. (1978) Transplacental transmission and fetal parasitosis of *Trypanosoma cruzi* in outbred White Swiss mice. *Am J Trop Med Hyg* 27:1108-1115.
 18. Desai M., ter Kuile, F.O., Nosten, F., McGready, R., Asamo, K., Brabin, B., Newman, R.D. (2007). Epidemiology and burden of malaria in pregnancy. *The Lancet infectious diseases*, 7(2), 93-104.
 19. Duaso J., Rojo G, Cabrera G, Galanti N, Bosco C, Maya JD, Morello A, Kemmerling U. (2010) *Trypanosoma cruzi* induces tissue disorganization and destruction of chorionic villi in an ex vivo infection model of human placenta. *Placenta* 31:705-711.
 20. Duaso J., Rojo G., Jaña F., Galanti N., Cabrera G, Bosco C., López-Muñoz R, Maya J.D., Ferreira J., Kemmerling U. (2011) *Trypanosoma cruzi* induces apoptosis in ex vivo infected human chorionic villi. *Placenta.* 32:356-361.
 21. Duaso J., Yanez E., Castillo C., Galanti N., Cabrera G., Corral G., Maya J.D., Zulantay I., Apt W., Kemmerling U. (2012) Reorganization of extracellular matrix in placentas from women with asymptomatic chagas

- disease: mechanism of parasite invasion or local placental defense? J. Trop Med. 2012 article ID. 758357.
22. Flórez O., Esper J., Higuera S., Barraza M.F., Cabrera H.B., Mantilla J.C., Rugeles C.I. (2010) Chagasic megacolon associated with *Trypanosoma cruzi* I in a Colombian patient. Parasitol Res. 107:439-442.
 23. Fretes R.E., Kemmerling U. (2012) Mechanisms of *Trypanosoma cruzi* placenta invasion and infection: the use of human chorionic villi explants. Journal of Tropical Medicine. 2012, article ID 614820.
 24. Guarner J., Bartlett J., Zaki S.R., Colley D.G., Grijalva M.J., Powell M.R. (2001) Mouse model for Chagas disease: immunohistochemical distribution of different stages of *Trypanosoma cruzi* in tissues throughout infection. Am J Trop Med Hyg 65:152-158.
 25. Jimenez-Coello M., Poot-Cob M., Ortega-Pacheco A., Guzman-Marin E., Ramos-Ligonio A., Sauri-Arceo C.H., Acosta-Viana K.Y. (2008) American trypanosomiasis in dogs from an urban and rural area of Yucatan, Mexico. Vector-Borne and Zoonotic Diseases 8: 755-762
 26. Kaufmann P., Black S., Huppertz B. (2003) Endovascular trophoblast invasion: implications for the pathogenesis of intrauterine growth retardation and preclampsia Biol Rep 69: 1-7.
 27. Kemmerling U., Boscoa C., Galanti N. (2010) "Infection and invasion mechanisms of *Trypanosoma cruzi* in the congenital transmission of chagas' disease: a proposal," Biol Res 43: 307–316
 28. Luquetti A.O., Tavares S.B.d.N., Siriano, L.A. Oliveira, R.A. Campos, D.E., Morais, C.A., Oliveira E.C. (2015) Congenital transmission of *Trypanosoma cruzi* in central Brazil. A study of 1,211 individuals born to infected mothers. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 110: 369-376.
 29. Martínez I., Noguera, B., Martínez-Hernández, F., Espinoza, B. (2013) Microsatellite and mini-exon analysis of Mexican human DTU I *Trypanosoma cruzi* strains and their susceptibility to nifurtimox and benznidazole. Vector Borne Zoon Dis 13:181-187.
 30. Mitchell B.F., Taggart M.J. (2009) Are animal models relevant to key aspects of human parturition? Am J Physiol Reg Integr Comp Physiol 297: R525-R545
 31. Mjihdi A., Lambot M.A., Stewart I.J., Detournay O., Noël J.C., Carlier Y., Truyens C. (2002) Acute *Trypanosoma cruzi* infection in mouse induces infertility or placental parasite invasion and ischemic necrosis associated with massive fetal loss. Am J Pathol. 161:673-80.
 32. Moreno E.A., Rivera I.M., Moreno, S.C., Alarcón, M.E., Lugo-Yarbuh, A. (2003) Vertical transmission of *Trypanosoma cruzi* in Wistar rats during the acute phase of the infection. Invest Clin 44:241-254.
 33. Moretti E., Basso B., Castro I., Paez M.C., Chaul M., Barbieri G., Feijoo D.C., Sartori M.J., Paez R. C. (2005) Chagas disease: study of congenital transmission in cases of acute maternal infection. Rev Soc Bras Med Trop 38: 53-55.

34. WHO (2017). La enfermedad de Chagas (tripanosomiasis Americana) nota descriptiva No 340. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/es/> accessed July 26/2017.
35. Pérez M.C., Alarcón M., Goncalves L., Lugo de Yarbuh A., Moreno E., Araujo S., Villarreal J. (2008) Anomalías morfológicas y estructurales en fetos de ratones con infección aguda experimental por *Trypanosoma cruzi*. Bol Mal Salud Amb 48: 127-134.
36. Pehrson P.O., Wahlgren M., Bengtsson E. (1981) Asymptomatic congenital Chaga's disease in a 5-year-old child. Scand J Infect Dis 13:307-308.
37. Rendell V.R., Gilman R.H., Valencia E., Galdos-Cardenaz G., Verastegui M., Sanchez I., Acosta J., Sanchez G., Ferrufino L., LaFuente C., Abastoflor M del C., Colanzi R., Bern C. (2015) *Trypanosoma cruzi*-infected pregnant women without vector exposure have higher parasitemia levels: implications for congenital transmission risk. PLoS ONE 10, e0119527.
38. Ribeiro A.L., Sabino E.C., Marcolino M.S., Salemi V.M.C., Lanni B.M., Fernandes F., Nastari L., Antunes A., Menezes M, Oliveira C.D.L., Sachdev V., Carrick D.M., Busch M.P., Murphy E.L., NHLBI Retrovirus Epidemiology Donor Study –II (REDS-II), International Component (2013) Electrocardiographic abnormalities in *Trypanosoma cruzi* seropositive and seronegative former blood donors. PLoS Negl Trop Dis, 7 (2013), p. e2078
39. Sala M.A., Lopes R.A., Carraro-Abrahamo A.A., Menguette C. (2006) Efecto de la infección aguda por diferentes cepas de *Trypanosoma cruzi* sobre el crecimiento intrauterino de fetos de raton. Parasitol Latinoam 61: 69-73.
40. Siriano L., da R., Luquetti A.O., Boaventura-Avelar J., Marra N.L., de Castro A.M. (2011) Chagas disease: increased parasitemia during pregnancy detected by hemoculture. Am J Trop med hyg 84: 569-574.
41. Schijman, A. G., Bisio, M., Orellana, L., Sued, M., Duffy, T., Jaramillo, A.M.M., Deborggraeve, S., Hjar G., Zulantay I., Lucero R.H., Velazquez E., Tellez T., Sanchez Leon Z., Galvão L., Nolder D., Monje Rumi M., Levi J.E., Ramirez J.D., Zorrilla P., Flores M., Jercic M.I., Crisante G., Añez N., De Castro A.M., Gonzalez C.I., Acosta-Viana K., Yachelini P., Torrico F., Robello C., Diosque P., Triana-Chavez O., Aznar C., Russomando G., Büscher P., Assal A., Guhl F., Sosa Estani S., DaSilva A., Britto C., Luquetti A., Ladzins J. (2011). International study to evaluate PCR methods for detection of *Trypanosoma cruzi* DNA in blood samples from Chagas disease patients. PLoS Negl Trop Dis, 5(1), e931.
42. Solórzano-Santos, F. (2008) Enfermedad de Chagas en el siglo XXI: Un panorama histórico. Bol Med Hosp Infant Mex 65:03-05.
43. Truyens C., Hermann E, Alonso-Vega C, Rodriguez P, Vekemans J, Torrico F, Carlier Y. (2005) Immune responses of non-infected neonates of mothers infected with *Trypanosoma cruzi*. Rev Soc Bras Med Trop. 38:96-100.
44. Van Heeswijk M., Nijhuis J.G., Hollanders H.M. (1990) Fetal heart rate in early pregnancy. Early Hum Dev 22:151-156.
45. Wali S., Gupta R., Veselenak R. L., Li Y., Yu J.J., Murthy A.K., Cap A.P., Guentzel M.N., Chamber J.P., Zhong G., Rank R.G., Pyles R.B.,

- Arulanandam B.P. (2014). Use of a guinea pig-specific transcriptome array for evaluation of protective immunity against genital chlamydial infection following intranasal vaccination in guinea pigs. *PLoS One*, 9(12), e114261.
46. Yadon Z.E., Schmunis G.A. (2009) Congenital Chagas disease: estimating the potential risk in the United States. *Am J Trop Med Hyg* 81:927-933.

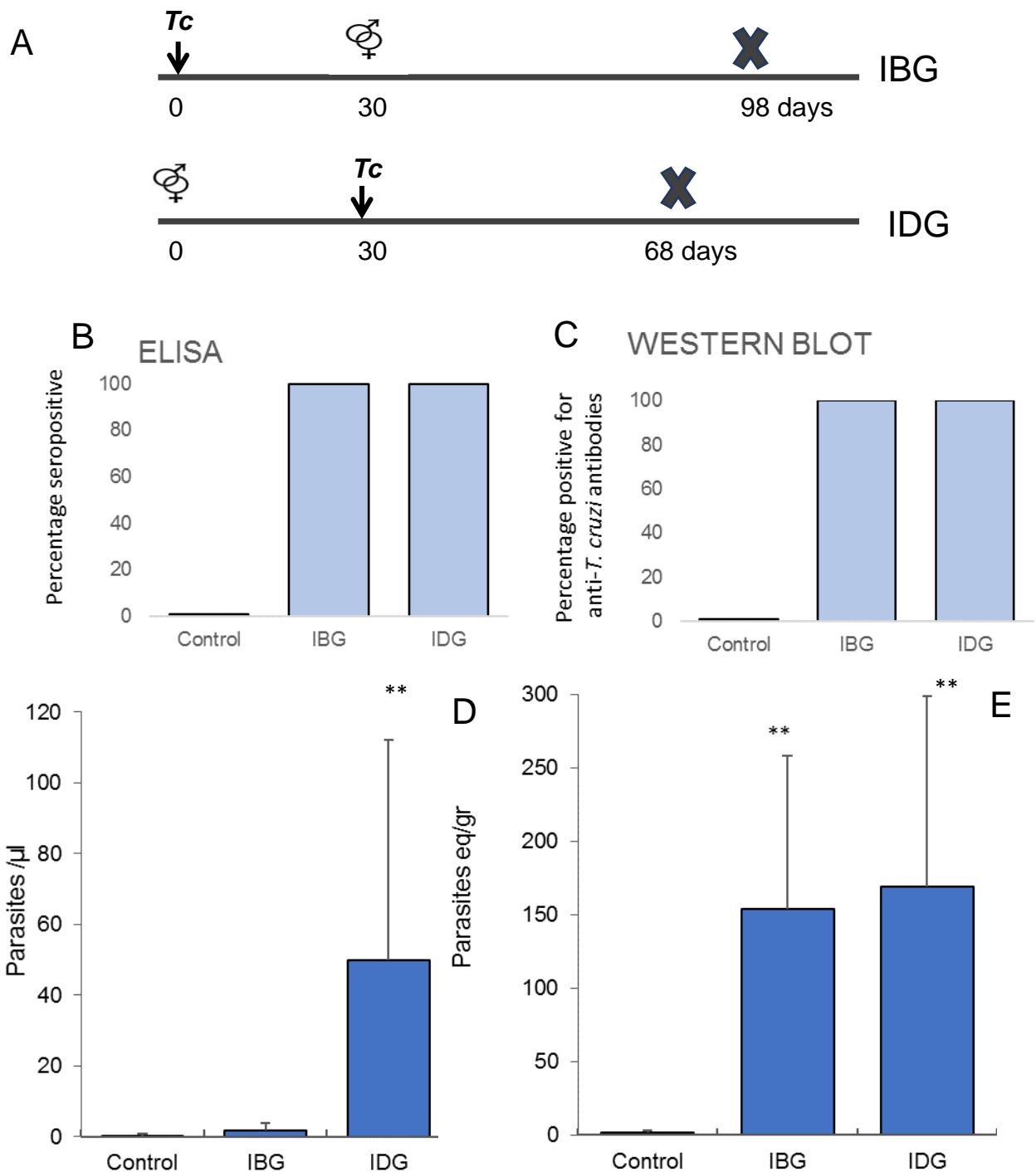


Figure 1. Serological and parasitological analysis of guinea pig dams infected with *T. cruzi*. (A) Chronogram of female guinea pigs infection before gestation (IBG) and infection during gestation (IDG). The breeding (♀), *T. cruzi* (*Tc*) inoculation (black arrow), and euthanasia (X) time-points (days) are shown. Females that were mated but not infected were used as controls. (B&C) Sera samples were analyzed by an ELISA (B) and Western blotting (C) to monitor the anti-*T. cruzi* antibodies in control, IBG and IDG dams at parturition. Bar graphs show the percentage of dams that were positive for anti-*T. cruzi* antibodies. (D&E). qPCR evaluation of blood (D) and heart tissue (E) parasite load in control, IBG and IDG dams is shown. * $P < 0.05$.

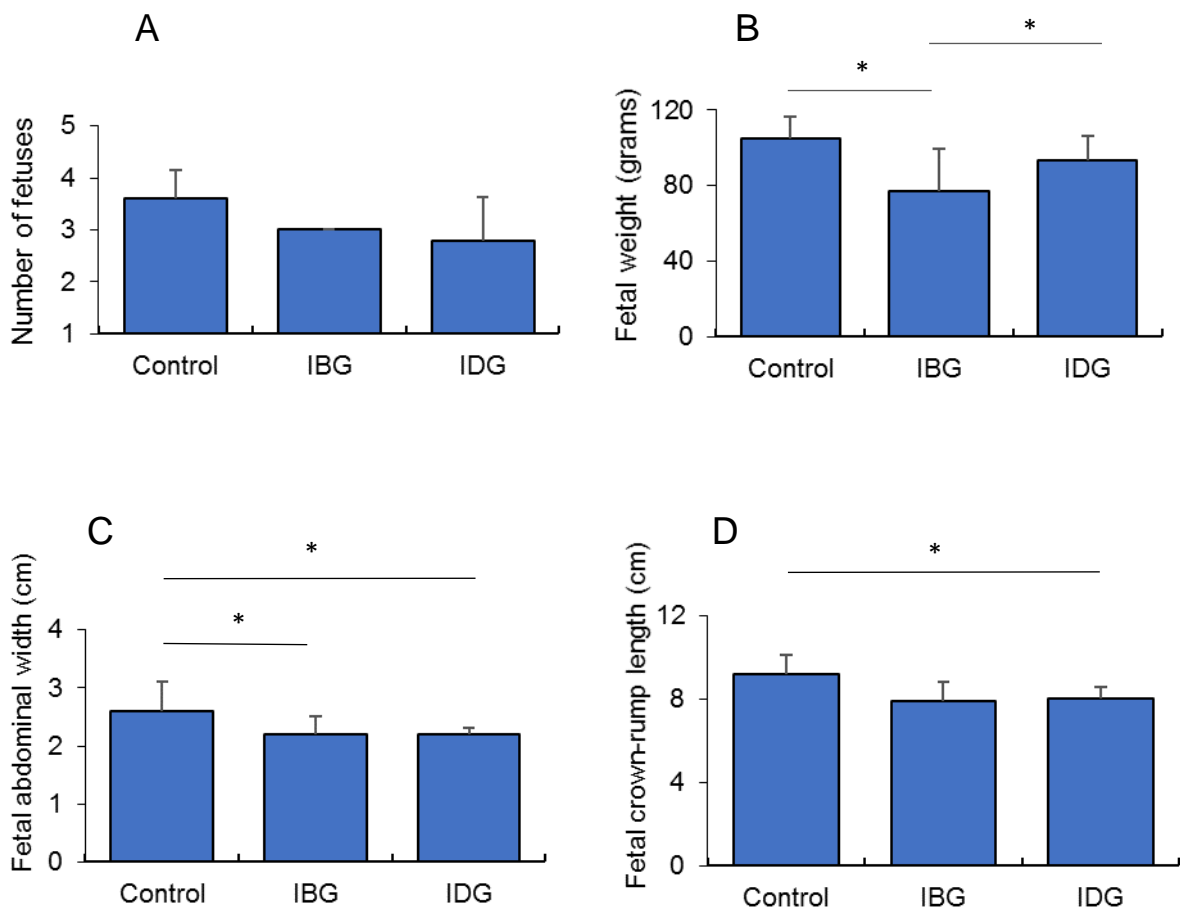


Figure 2. Female guinea pigs were infected before gestation (IBG) or during gestation (IDG) as shown in Fig.1A. Guinea pigs that were mated but not infected were used as controls. Fetal characteristics, including number of fetuses carried per guinea pig (A), and weight (B), abdominal width (C) and crown-rump length (D) of fetuses were monitored close to parturition. Data are presented as mean value \pm SD, and significance (* $P < 0.05$, control vs. infected) is plotted.

Table 1. Frequency and severity of lesions in organs from fetuses of guinea pigs infected before gestation (IBG) or infected during gestation (IDG), compared with control group (CG).

Fetal tissues	Groups	Inflammatory infiltrate		Cellular necrosis (Percentage)	Fiber degeneration (Percentage)
		Percentage	Score		
Heart	CG	0%	0	0%	0%
	IBG	25%	1	58.3%	41.6%
	IDG	16.6%	2	50%	66.6%
Skeletal muscle	CG	0%	0	0%	0%
	IBG	22.2%	1	33.3%	44.4%
	IDG	9%	1	63.6%	54.5%
Placenta	CG	Inflammatory infiltrate		Dystrophic calcification (Percent)	
		Percent	Score		
		0%	0	100%	
		0%	0	100%	
	IDG	0%	0	100%	

Female guinea pigs were infected before gestation (IBG) or during gestation (IDG) as described in Fig.1A. Control group (CG) included females that were mated but not infected. Females were euthanized towards the end of pregnancy. Fetal tissue sections from CG (n=9), IBG (n=9), and IDG (n=5) fetuses were stained with H&E (two sections per tissue), and analyzed by light microscopy (>10 microscopic fields per tissue section). Semi-quantitative score for inflammatory infiltrate was calculated as (0) Absent, (1) Focal or mild, 0-1 foci, (2) Moderate ≥ 2 foci, (3) extensive

inflammation foci, minimal necrosis, and retention tissue integrity, (4) Diffuse inflammation with severe tissue necrosis, interstitial edema and loss integrity.

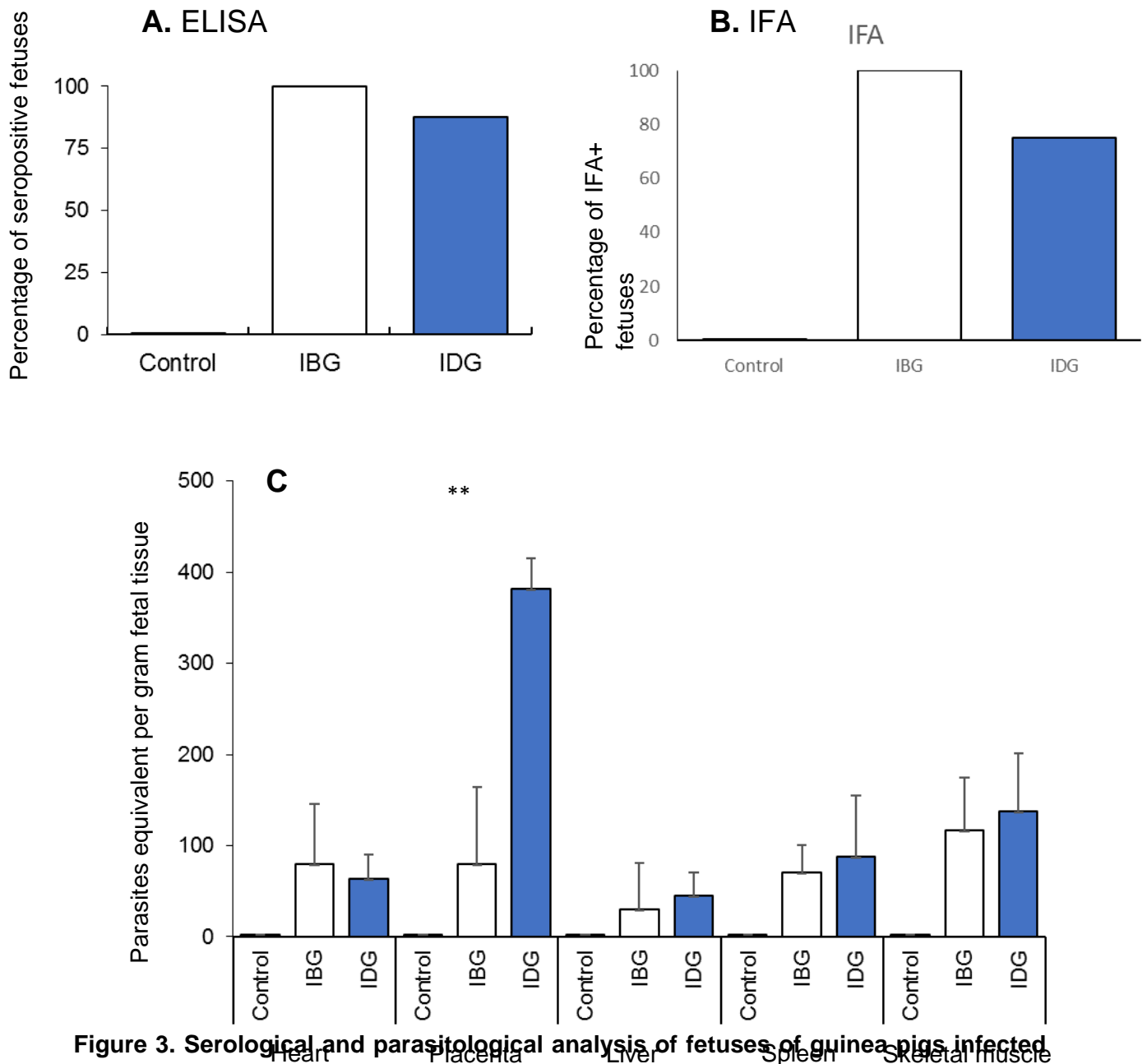


Figure 3. Serological and parasitological analysis of fetuses of guinea pigs infected with *T. cruzi*. Female guinea pigs were infected before gestation (IBG) or during gestation (IDG) as shown in Fig.1A (controls: no infection). **(A&B)** Sera samples of fetuses were obtained close to parturition, and analyzed by an ELISA (A) and indirect immunofluorescence assay (B). Bar graphs show the percentage of fetuses in each group that were positive for anti-*T. cruzi* antibodies. **(C)** Fetal tissue parasite load was monitored by quantitative PCR as described in Materials and Methods. Control (n=9); IBG (n= 9); IDG (n= 5) samples were analyzed in triplicate. Data in panel A & B are presented as absolute values, and data in panel C are presented as mean value ± SD. (**P <0.01, IDG vs. IBG).

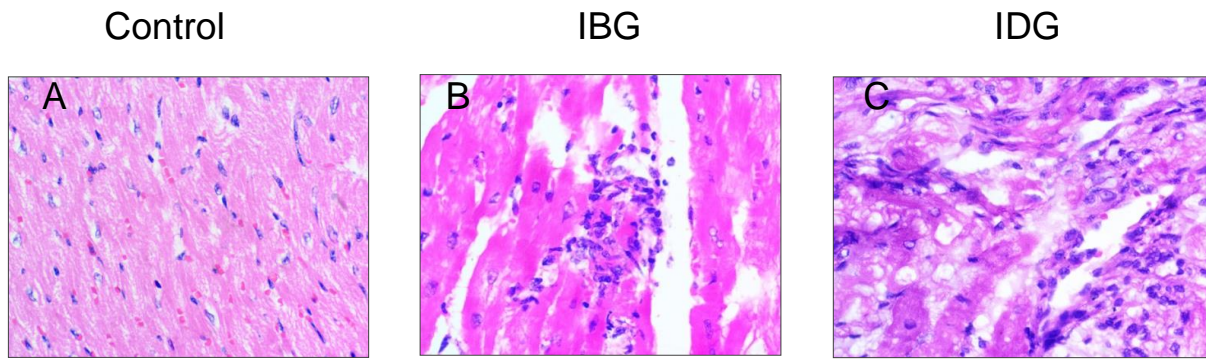


Figure 4. Histological analysis of the heart of dams. Guinea pigs were infected with *T. cruzi* before (IBG) or during (IDG) gestation, and harvested close to parturition, as described in Materials and Methods and Fig.1A. Shown are the representative images of the H&E staining of the heart tissue sections from **(A)** Negative control, **(B)** IBG, and **(C)** IDG dams.

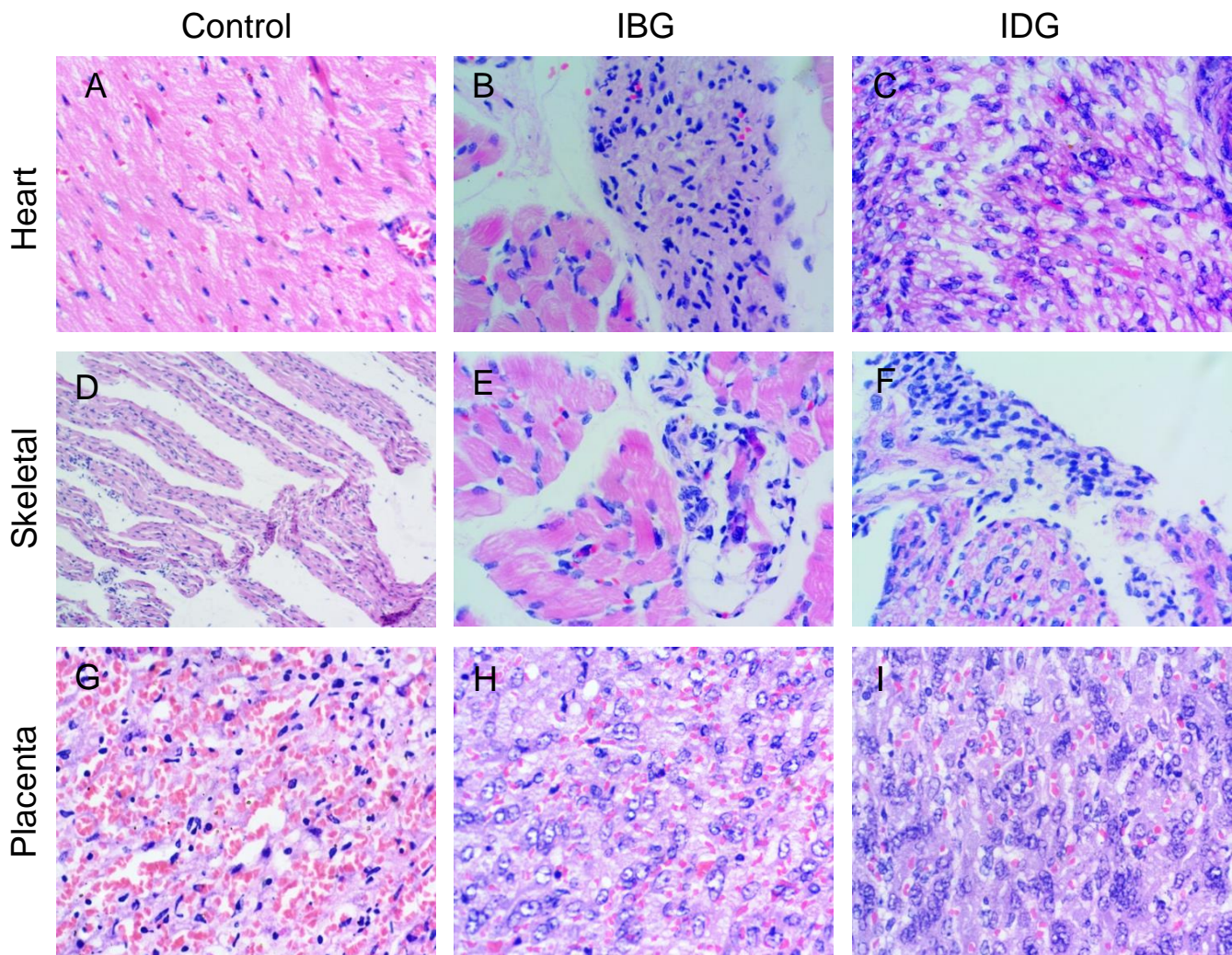


Figure 5. Histological analysis of the fetal tissues. Guinea pigs were infected with *T. cruzi* before (IBG) or during (IDG) gestation, and harvested close to parturition, as described in Materials and Methods and Fig.1A. Guinea pigs that were mated but not infected were used as controls. Shown are the representative images of the H&E staining of the fetal heart (A-C), fetal skeletal muscle (D-F), and fetal placenta (G-I) carried by control (A, D, G), IBG (B, E, H), and IDG (C, F, I) dams.

V. CONCLUSIÓN GENERAL

Se ha demostrado que *Cavia porcellus* puede ser un modelo de estudio para la infección por *T. cruzi* y transmisión materno-fetal. Incluso en dosis bajas (100 parásitos) de *T. cruzi* DTU I fue suficiente para establecer una alta tasa de transmisión congénita a los fetos.

La frecuencia de transmisión a los fetos fue alta, independientemente de si la madre estuvo expuesta a la infección antes o durante la gestación, aunque la extensión del daño al tejido fetal tendió a ser mayor cuando las madres fueron expuestas al parásito durante la gestación.

VI. ANEXOS

Anexo 1. Protocolo de anestesia-eutanasia

Fecha: Peso	Animal: Jaula:	Experimento 1 (-) (+) # Crías
----------------	-------------------	----------------------------------

Este procedimiento tiene como fundamento mostrar las estrategias de anestesia, analgesia y eutanasia más recomendables en *Cavia porcellus* infectadas experimentalmente con *T. cruzi*

Material necesario:

- Isoflurano
- Pentobarbital sódico
- Agujas de 25-27 G.
- Jeringas de 1 mL
- Alcohol
- Máquina de anestesia inhalatoria
- Circuito anestésico
- Mascarilla anestésica
- Máquina de rasurar
- Torundas

Fármacos empleados en el procedimiento

Fármaco	Dosis	Cantidad aplicada	Comentarios
Isoflurano	5% para inducción		Vaporizador calibrado

Sedantes empleados en el procedimiento

Fármaco	Dosis	Cantidad aplicada	Comentarios
Xilacina	5-40mg/kg (IM)		Sedación

Anestésicos empleados en el procedimiento

Fármaco	Dosis	Cantidad aplicada	Comentarios
Pentobarbital	210mg/kg (IT)		Depresor respiratorio

CONSTANTES FISIOLÓGICAS(BASAL)	Consideraciones para dar por muerto al animal
FC FR TR SPO PAS PAM PAT CC	<ul style="list-style-type: none"> ○ Amnesia, inconsciente, sueño, incoordinación de movimientos ○ Reducción de los reflejos ○ Reducción de estímulos aferentes ○ Relajación de musculatura esquelética ○ Ligera depresión respiratoria y cardiovascular ○ Grave depresión ○ Apnea ○ Orientación del ojo es central. (pérdida de todos los reflejos) ○ Paro cardíaco ○ Muerte

Anexo 2. Formato del Reporte para el registro de necropsias

Fecha:	Animal:	Experimento 1 (-) (+)
Peso:	Jaula:	# Crías:

Curso de la enfermedad: Agudo Crónico

- Piel** Pálida Cianosis Dermatitis Heridas
- Cavidad torácica** Fibrina Líquidos
- Corazón** Fibrina Endocarditis Pericarditis
- Pulmones** Abscesos Necróticos Hemorrágico Adherencias
- Cavidad abdominal** Fibrina Líquidos
- Hígado** Pálido Manchas blancas Fibrina
- Bazo** Agrandado Infartos Fibrina
- Riñones** Agrandado Manchas blancas Hemorragias
- Intestino delgado** Fibrina Congestionado Engrosado Necrótico
- Intestino grueso** Fibrina Congestionado Engrosado Necrótico
- Estomago** Gastritis Ulcera Hemorrágico

Observaciones:

Toma de muestras

Madre (ANIMAL #) Cría 1 () Cría 2 () Cría 3 ()

Peso: Peso: Peso: Peso:

- | | Histo. | Biología mol. | Histo. | Biología a mol. | Histo. | Biología a mol. | Histo. | Biología a mol. |
|--------------------------------------|---------------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|
| <input type="radio"/> Placenta-útero | <input type="radio"/> Placenta-útero | <input type="radio"/> Corazón Cría | <input type="radio"/> Corazón Cría | <input type="radio"/> Corazón Cría | <input type="radio"/> Corazón Cría | <input type="radio"/> Corazón Cría | <input type="radio"/> Corazón Cría | <input type="radio"/> Corazón Cría |
| <input type="radio"/> Corazón | <input type="radio"/> Corazón | <input type="radio"/> M. psoas | <input type="radio"/> Hígado | <input type="radio"/> M. psoas | <input type="radio"/> Hígado | <input type="radio"/> Psoas | <input type="radio"/> Psoas | <input type="radio"/> Hígado |
| | <input type="radio"/> Sangre | | <input type="radio"/> Bazo | | <input type="radio"/> Bazo | | <input type="radio"/> Bazo | |
| | <input type="radio"/> Sangre sin EDTA | | <input type="radio"/> Psoas | | <input type="radio"/> Psoas | | <input type="radio"/> Psoas | |

Medidas morfométricas

Madre	Cría 1	Cría 2	Cría 3
Observaciones:	Tamaño cría Largo: _____ Ancho: _____ Diámetro: _____ Otro: _____	Tamaño cría Largo: _____ Ancho: _____ Diámetro: _____ Otro: _____	Tamaño cría Largo: _____ Ancho: _____ Diámetro: _____ Otro: _____

Anexo 3. Hoja de monitoreo

Hoja de valoración para cobayos infectados con <i>T. cruzi</i> experimentalmente IAG () IDG ()

Jaula: infección:	Animal:	Peso previo	Infección:	Fecha de
Fecha				
Día				
Hora				
A distancia				
No activo				
Si inactiva respuesta a luz roja				
Aislado				
Acaparador				
Encorvado				
Abdomen punzante				
Pelo erizado				
Frecuencia Respiratoria*				
Condición Corporal (1-5)				
No acicalamiento				
En el manejo				
Alerta				
No come/No bebe				
Peso (g)				
% pérdida de peso				
Temperatura				
Daños en tegumento				
Diarrea				
No heces				
Deshidratación				
Raquis rígido				
Extremidades azules				
Vocalizaciones				
NAD (Nada Anormal Detectado)				

Detalles de puntuación: *Respiración R= rápida, S= superficial, D= dificultosa, N= normal

Se calificara cada serl con un signo: **(+ Anormal (-) Normal

Punto final y acciones:

1. Diarrea, deshidratación por más de 48hrs. El animal deberá ser sacrificado
2. Con una pérdida de un 20% de peso informar al MVZ. Más de un 25% sacrificar al animal

Medidas científicas:

Si se sacrifica el animal, se procederá a tomar muestras sanguíneas, tejido cardiaco, útero-placenta. Y de las crías será hígado, bazo, músculo esquelético y corazón.