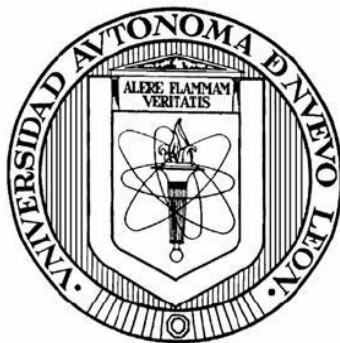


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



DETERMINACIÓN DE DOSIS INFECTIVA VÍA ORAL DE LA CEPA
NEOLONESA DE FORMAS DE *Trypanosoma cruzi* (CHAGAS, 1909)
A NIVEL EXPERIMENTAL EN MODELO MURINO

POR

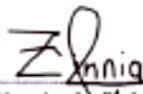
Q.B.P. JORGE ANDRÉS DELGADO GARDUÑO

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN MICROBIOLOGÍA

Julio, 2020

**DETERMINACIÓN DE DOSIS INFECTIVA VÍA ORAL DE LA CEPA
NEOLONESA DE FORMAS DE *Trypanosoma cruzi* (CHAGAS, 1909)
A NIVEL EXPERIMENTAL EN MODELO MURINO**

Comité de Tesis

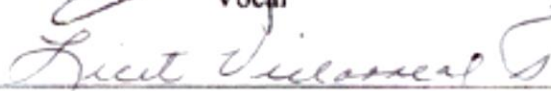


Dra. Zinnia Judith Molina Garza
Presidente



Dr. Lucio Galaviz Silva
Secretario

Dr. Arturo Espinoza Mata
Vocal



Dra. Licet Villarreal Treviño
Vocal

Dra. María Porfiria Barrón González
Vocal

Dr. José Cuauhtémoc Ibarra Gamez
Asesor externo

AGRADECIMIENTOS

A Dios, por estar siempre conmigo y demostrarme que es fiel en todo momento.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) y al Programa de Apoyo a la Investigación Científica y Tecnológica (PAICyT), por otorgarme el apoyo económico para la realización de este proyecto.

A la Dra. Zinnia Molina y Dr. Lucio Galaviz, por la confianza y el apoyo brindado, académico y emocional durante este tiempo. Gracias por ser unos excelentes asesores y profesores, por apoyar a los alumnos y alentar a siempre seguir adelante. Su trabajo habla por ustedes.

Al Dr. Arturo Espinoza, Dra. Licet Villarreal y Dra. Porfiria Barrón, por el apoyo que dieron a este proyecto, ya sea estratégicamente o en presencia.

A la Q.B.P. Jennifer Leos, Dr. Cuauhtémoc Ibarra, Dr. Jorge Hernández, M.C. Juan Arzave y M.C. Mario Hernández, por su colaboración en este proyecto, gracias a ustedes logré tener completa mi tesis.

Al Dr. José Ignacio González y Dr. Antonio Guzmán, por estar siempre pendiente de mí en cada paso y por su respaldo continuo durante todo este tiempo.

Al M.C. Francisco Sánchez, por brindarme sus palabras de motivación y consejos, los cuales me sirvieron mucho.

A mis padres, Jorge y Carmen, por apoyarme incondicionalmente durante este tiempo y demostrarme que me aman aún en mis altibajos, los amo.

A mi hermana, Mely, por siempre apoyarme en cada paso, darme palabras de aliento y retarme a seguir creciendo.

A mis abuelitas, Loren y Bertha, por brindarme su amor y cuidado.

A mis padrinos, Jesús, Hortencia, y mis tías Caty y Belia, por siempre darme consejos que me sirvieron mucho durante este tiempo, no ha sido en vano cada palabra dicha por ustedes.

A mis primos y familiares, Antonio, Santiago, Diego, Alejandra, Paula, Edhy y Paolo, por motivarme a mejorar siempre y estar ahí para mí.

A mis amigos y compañeros de laboratorio, Gabriel, Vida, Fernanda, Nancy, Mariana, Ángel, Karen, Martín y Karla, así como los muchachos de servicio social, Rubí, Paula, Paloma, Alan y Oziel, por estar cada momento y darme su apoyo, física y moralmente, sin ustedes, esto no hubiera sido posible.

A mis amigos y compañeros de generación, Andrea, Axel y César, por estar conmigo en este viaje tan loco, convertirse en mis hermanos y ser parte fundamental de mi crecimiento, sin ustedes no hubiera llegado hasta aquí.

A Irving, por entenderme y estar al pendiente de mí siempre, gracias por ser el mejor.

A Marla, por siempre haber estado ahí para mí en los momentos más difíciles, gracias por escucharme.

A mis amigos, Carlos, Claudia, Gerardo, Ynessi y Nallely, por orar por mí, alegrarse en mis altas y animarme en mis bajas.

A mis amigos, Karen, Marycruz, Manuel y Yamileth, por ser quienes son en mi vida, la completan.

A mis pastores, Víctor y Sofía, por su amor y apoyo incondicional constante.

Al la Dra. Kathiuska Arévalo, Lic. Mirthala Paez y Lic. Mónica Delgado, por todo el apoyo durante estos dos años, gracias por su paciencia.

A cada persona que de alguna manera fue un obstáculo para llegar a esta meta, física o emocionalmente, de no haberme retado no hubiera llegado hasta aquí.

DEDICATORIA

A Dios y a mis padres.

“Nadie te podrá hacer frente en todos los días de tu vida;
como estuve con Moisés, estaré contigo; no te dejaré, ni te desampararé.”

Josué 1:5

ÍNDICE

ÍNDICE DE TABLAS.....	vii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	viii
LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS.....	x
RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	2
INTRODUCCIÓN	3
ANTECEDENTES	5
Enfermedad de Chagas	5
<i>Trypanosoma cruzi</i> y su ciclo biológico	5
Sintomatología	8
Transmisión vectorial.....	9
Vectores en Sur América	9
Reservorios.....	9
Reservorios en Nuevo León	10
Transmisión por transfusiones.....	10
Transmisión congénita	10
Transmisión vía oral	10
Alimentos asociados	11
Tipo de jugos de frutas.....	11
Casos clínicos por transmisión oral	12
Diagnóstico	14
Tratamiento	15
Histotropismo.....	16
Consumo de jugo de frutas naturales por ratones	16
JUSTIFICACIÓN	18
HIPÓTESIS	19
OBJETIVO	20
Objetivo general	20
Objetivos específicos.....	20

MATERIAL Y MÉTODOS	21
Cultivo de la cepa neolonesa de <i>T. cruzi</i> en forma epimastigote	21
Preparación de jugos naturales	21
Aislamiento de <i>T. cruzi</i>	22
Inoculación de muestras con formas epimastigotes de <i>T. cruzi</i>	23
Suministro de jugos contaminados a roedores	23
Extracción de ADN en ratones de fase aguda	26
Confirmación molecular por técnica de PCR	26
Confirmación histopatológica	27
Microscopía electrónica de transmisión (MET)	27
Análisis estadístico	28
RESULTADOS	29
Preparación de jugos naturales	29
Inoculación de muestras con formas epimastigotes de <i>T. cruzi</i>	30
Suministro de jugos contaminados a roedores	34
Confirmación molecular por técnica de PCR	35
Confirmación histopatológica	37
Microscopía electrónica de transmisión (MET)	43
Análisis estadístico	45
DISCUSIÓN	46
CONCLUSIÓN	49
PERSPECTIVAS	50
BIBLIOGRAFÍA	51
ANEXO	58
Carta de autorización de uso de animales experimentales por parte del Comité de Ética de la Facultad de Ciencias Biológicas, UANL	58

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla	Pág.
Tabla 1. Factores de riesgo en personas con y sin enfermedad de Chagas oral.....	12
Tabla 2. Nomenclatura de soluciones de jugo natural de naranja.....	21
Tabla 3. Nomenclatura de tratamientos en los ratones.....	24
Tabla 4. Grados Brix de las soluciones de jugos naturales.....	29
Tabla 5. Supervivencia de formas epimastigotes de <i>T. cruzi</i> en jugo natural de naranja a temperatura óptima de crecimiento ($28\pm 1^{\circ}\text{C}$).....	31
Tabla 6. Supervivencia de formas epimastigotes de <i>T. cruzi</i> en jugo natural de naranja a temperatura de refrigeración (4°C).....	32
Tabla 7. Nomenclatura de la amplificación por la técnica de PCR.....	44

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Pág.
Figura 1. Formas evolutivas de <i>T. cruzi</i>	6
Figura 2. Ciclo de vida de <i>T. cruzi</i>	7
Figura 3. Distribución de signos y síntomas en brotes de la enfermedad transmitida de Chagas oralmente.....	8
Figura 4. Métodos de diagnóstico utilizados en brotes de enfermedad de Chagas aguda transmitidos por vía oral.....	15
Figura 5. Preparación de jugos naturales de naranja.....	22
Figura 6. Suministro de jugo contaminado a roedor.....	24
Figura 7. Extracción de sangre contaminada de ratón infectado.....	25
Figura 8. Supervivencia de formas epimastigote de <i>T. cruzi</i> en jugo de naranja.....	30
Figura 9. Supervivencia de formas epimastigotes de <i>T. cruzi</i> en jugo natural de naranja con diferentes soluciones.....	33
Figura 10. Supervivencia de ratones con diferentes tratamientos.....	34
Figura 11. Amplificación de gen mini exón de <i>T. cruzi</i> en los tratamientos realizados.....	35
Figura 12. Nidos de amastigote en tejido de esófago del tratamiento 6.....	37
Figura 13. Nidos de amastigote en tejido de intestino del control positivo cepa internacional Brener.....	38
Figura 14. Nidos de amastigote en tejido de intestino del tratamiento 6.....	38
Figura 15. Nidos de amastigote en tejido de intestino del tratamiento 6.....	39

Figura 16. Nidos de amastigote en tejido de intestino del tratamiento 6.....	39
Figura 17. Nidos de amastigote en tejido de intestino del tratamiento 6.....	40
Figura 18. Nidos de amastigote en tejido de colon del control positivo jugo con cepa Brener.....	40
Figura 19. Nidos de amastigote en tejido de colon del tratamiento 3.....	41
Figura 20. Nidos de amastigote en tejido de colon del tratamiento 3.....	41
Figura 21. Nidos de amastigote en tejido de colon del tratamiento 6.....	42
Figura 22. Amastigote en tejido de intestino del tratamiento 6.....	43
Figura 23. Amastigote en tejido de intestino del tratamiento 6.....	43
Figura 24. Amastigote en tejido de colon del tratamiento 6.....	44
Figura 25. Amastigote en tejido de colon del tratamiento 6.....	44

LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

%	Por ciento
<	Menor que
±	Más-menos
-	Menos
°Bx	Grados Brix
°C	Grados Celsius
μL	Microlitros
μM	Micromolar
ADN	Ácido desoxirribonucleico
CDC	Centers for Disease Control
cm	Centímetros
cm ³	Centímetros cúbicos
DNA	Deoxyribonucleic acid
dpi	Días post-infección
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
<i>et al.</i>	Y colaboradores
g	Gramos
FCB	Facultad de Ciencias Biológicas
GI	Infección gastrointestinal
h	Horas
H ⁺	Ion hidrógeno
IgG	Inmunoglobulina G
IP	Intraperitoneal
ITSON	Instituto Tecnológico de Sonora
kg	Kilogramos
LIT	Medio infusión de hígado y triptona
MET	Microscopía electrónica de transmisión
mg	Miligramos
min	Minutos

mL	Militros
mM	Milimolar
mm ³	Milímetros cúbicos
N.A.	No aplica
ng	Nanogramos
OI	Infección oral
OMS	Organización Mundial de la Salud
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
pH	Potencial de iones hidrógeno
PI	Post-infección
pp.	Páginas
rpm	Revoluciones por minuto
s	Segundos
SPSS	Statistical Package for the Social Sciences
TAE	Tris-Acetato-EDTA
UANL	Universidad Autónoma de Nuevo León
UNAM	Universidad Nacional Autónoma de México
Vol.	Volumen

RESUMEN

Trypanosoma cruzi es el agente causal de la enfermedad de Chagas, la cual se descubrió por primera vez en Brasil en 1909. La sintomatología muchas veces es confundida con otras enfermedades debido a que la fase aguda presenta síntomas comunes como fiebre, sin embargo, existen métodos de diagnóstico de la enfermedad eficientes que se pueden utilizar. El protozooario puede infectar al humano mediante diferentes tipos de transmisión, tales como vectorial, de transfusión sanguínea, congénita y oral, ésta última es el enfoque del estudio, ya que el consumo de alimentos y bebidas contaminados por el parásito puede provocar la enfermedad en quien los consuma. Para comprobar esto, se realizó la preparación de jugos naturales de naranja para realizar la inoculación de muestras con formas epimastigotes de *T. cruzi* y lograron sobrevivir después de 21 h, de manera que se confirmó la sobrevivencia del parásito. Posteriormente, se suministraron los jugos contaminados a los roedores con diferentes concentraciones; debido a que no se observaron los tripomastigotes en sangre de ratón en fase aguda se extrajo el ADN del parásito para después confirmar la infección molecularmente por PCR. Asimismo, se realizaron cortes histológicos y microscopía electrónica de transmisión (MET) a partir de tejido infectado de los ratones que murieron y los que fueron sacrificados, en los cuales se observaron nidos de amastigotes de *T. cruzi* en el tratamiento de mayor concentración (1.5 millones de células/mL), por lo que se logró confirmar por segunda vez la infección vía oral. Mediante un análisis de varianza con la prueba de Tukey se determinó que no existe diferencia significativa en los tratamientos. Con base a lo obtenido, podrían realizarse ensayos con otros frutos (o alimentos) o evaluaciones para medir la sobrevivencia del parásito en la superficie de estos frutos.

ABSTRACT

Trypanosoma cruzi is the causative agent of Chagas disease, which was first discovered in Brazil in 1909. The symptomatology is often confused with other diseases because the acute phase presents common symptoms such as fever, however, there are efficient diagnosis methods of disease that can be used. The protozoan can infect humans through different types of transmission, such as vector, blood transfusion, congenital, and oral, the latter is the focus of the study as the consumption of contaminated food and beverages by the parasite can cause the disease in those who consume them. To verify this, preparation of natural orange juices was carried out to inoculate samples with epimastigote forms of *T. cruzi*, which survived after 21 h, so the survival of the parasite was confirmed. Subsequently, contaminated juices were supplied to rodents with different concentrations; because of trypomastigotes were not observed in mice blood in the acute phase, DNA was extracted from the parasite and then the infection was confirmed molecularly by PCR. Likewise, histological sections and transmission electron microscopy (TEM) were performed from infected tissue of the mice that died and those that were sacrificed and nests of amastigotes of *T. cruzi* were observed in the treatment with the highest concentration (1.5 million cells/mL), so the oral infection was confirmed for a second time. An analysis of variance with the Tukey test determined that there is no significant difference between the treatments. Based on what was obtained, tests could be carried out with other fruits (or foods) or evaluations to measure the survival of the parasite on the surface of these fruits.

INTRODUCCIÓN

La enfermedad de Chagas o tripanosomiasis es una enfermedad cuyo agente etiológico es el protozooario *Trypanosoma cruzi* y su incidencia es estimada en 200,000 casos por año; la Organización Mundial de la Salud (OMS) ha indicado que entre 7 y 8 millones de personas están infectadas con la enfermedad en América Central (Pereira *et al.*, 2009). Se estima que 1.1 millones de personas se encuentran infectadas en México (Rojo *et al.*, 2018). Los modos predominantes de transmisión de la enfermedad de Chagas son a través de las deyecciones contaminadas de insectos triatominos que se alimentan de sangre, mediante transfusión de sangre, ingestión de alimentos y líquidos contaminados con parásitos y congénitos de la madre al feto, además, los mecanismos menos frecuentes son los accidentes de laboratorio, el manejo de animales infectados y los trasplantes de órganos de donantes afectados por la enfermedad de Chagas (Coura, 2015).

A partir de 1990 se encontraron dos casos de personas infectadas con *T. cruzi* por transmisión oral en Colombia y reaparecieron 10 nuevos casos en 2002 (Filigheddu *et al.*, 2017). Los pocos estudios que han investigado las vías de infección orales e intraperitoneales se han realizado principalmente en ratones, en donde se encontró que el linaje de *T. cruzi* influye en la infección murina por estas vías, por lo que se observó, que tanto la forma infecciosa del parásito como el volumen del inóculo influyen diferencialmente en la tasa de infectividad en base a diferentes rutas de inoculación y se demostró que el sitio inicial de entrada del parásito afecta de manera crítica la respuesta inmune del hospedero y el resultado de la enfermedad (Barreto *et al.*, 2015).

El ciclo de vida de *T. cruzi* es complejo, con varias etapas de desarrollo en insectos vectores (en donde parece no estar afectado por la infección con el parásito) y hospederos mamíferos; los tripomastigotes en el torrente sanguíneo no replicativo y amastigotes intracelulares replicativos son las formas típicas del organismo que se identifican en hospederos mamíferos, mientras que los epimastigotes replicativos y los tripomastigotes metacíclicos infecciosos infectan el vector triatomino, lo cual es la etapa aguda, en donde todos los tipos de células nucleadas en el hospedero humano son los blancos potenciales para la infección y con el desarrollo de la respuesta inmune, la parasitemia se reduce a

una concentración subpatente y el número de parásitos en los tejidos disminuye sustancialmente, lo que permite el fin de la fase aguda; sin embargo, dado que el parásito no se elimina por completo, la infección de tejidos específicos, como los ganglios musculares o entéricos, persiste indefinidamente durante la vida del hospedero (Rassi *et al.*, 2010).

Debido a la importancia de la transmisión oral de la enfermedad de Chagas, en este estudio, el objetivo fue buscar la dosis infectiva vía oral de *T. cruzi* de la cepa neolonesa en modelo murino y determinar a nivel experimental su patología en el hospedero.

ANTECEDENTES

Enfermedad de Chagas

Más de un siglo después del descubrimiento de la enfermedad por Carlos Chagas, a pesar de los avances en el control de la enfermedad en países endémicos, la enfermedad de Chagas es actualmente una preocupación para la salud pública debido a su globalización (Margioto, 2016).

Trypanosoma cruzi y su ciclo biológico

Trypanosoma cruzi es un protozooario hemoflagelado y agente causal de la enfermedad de Chagas. El ciclo de vida natural de *T. cruzi* incluye el paso a través de dos tipos de hospederos. Los hospederos intermediarios incluyen insectos verdaderos hemípteros hematófagos llamados triatomíneos, en donde *T. cruzi* se multiplica en el tracto digestivo. El hospedero definitivo consiste en mamíferos como los humanos, en donde generalmente el parásito circula en la sangre y se aloja en el tejido muscular y/o cardíaco de estos (Coura, 2003).

Este parásito tiene un rango de longitud que va entre 12 y 30 μm y posee tres formas: epimastigote (fase de división), tripomastigote (fase infectiva) y amastigote (fase infectiva en tejido) (Kohl y Bastin, 2005). El epimastigote tiene una forma elongada, con kinetoplasto en forma de barra o bastón que está en la región anterior del núcleo; esta fase es la que se encuentra en el tubo digestivo del vector y en cultivo axénico (Figura 1). En cuanto al tripomastigotes, tiene forma elongada, fina y larga, y tiene un kinetoplasto terminal o subterminal largo, un núcleo ubicado en el centro de la célula, una membrana ondulante y un flagelo que recorre la membrana ondulante y deja el cuerpo en la parte final anterior; esta es la forma infectiva del parásito y puede ser encontrada en el vector, sangre y espacio intercelular de hospederos vertebrados; en glándulas anales de mamíferos del género *Didelphis* y cultivos de células infectadas (CDC, 2019). La forma de amastigote es redondeada y tiene kinetoplasto en forma de barra o bastón en la región anterior del núcleo como epimastigote, pero difiere en que esta tiene un flagelo corto; esta

forma puede ser encontrada en el interior de las células de hospedadores infectados, así como en cultivo axénico (Figura 1) (Díaz y González, 2014).

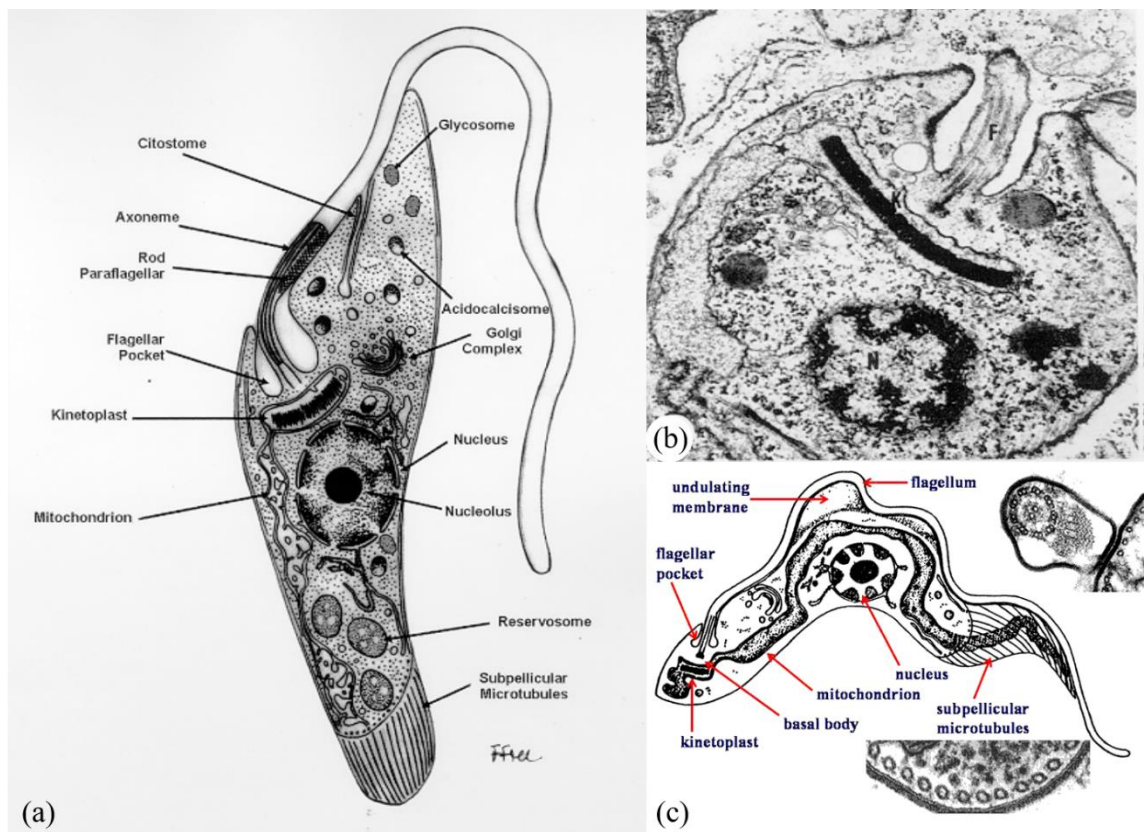


Figura 1. Formas evolutivas de *T. cruzi*. (a) Epimastigote, (b) amastigote, (c) tripomastigote (de Souza, 1999).

Un vector infectado toma su alimento de la sangre y al mismo tiempo libera tripomastigotes en sus heces cerca del sitio de la herida de la mordedura en la persona. Los tripomastigotes ingresan al huésped a través de la herida o por medio de las membranas mucosas intactas, como la conjuntiva, esto puede ser al momento de que el hospedero se rasca o por una herida. Una vez dentro del hospedero, los tripomastigotes invaden las células cerca del sitio de inoculación, donde se diferencian en amastigotes intracelulares. Los amastigotes se multiplican mediante fisión binaria y se diferencian en tripomastigotes, para después liberarse en la circulación como tripomastigotes en el torrente sanguíneo. Los tripomastigotes logran infectar células en una variedad de tejidos y se transforman en amastigotes intracelulares en nuevos sitios de infección. Durante este ciclo infeccioso se presentan algunas manifestaciones clínicas. Los tripomastigotes del

torrente sanguíneo no se replican (a diferencia de los tripanosomas africanos). La replicación puede continuar sólo cuando los protozoarios entran en otra célula o son ingeridos por algún otro vector. El vector se infecta al momento de que se alimenta de la sangre humana o animal que contiene a los parásitos circulantes. Los tripomastigotes ingeridos se transforman en epimastigotes en el intestino medio del vector. Después los parásitos se multiplican y diferencian en el intestino medio y finalmente se diferencian en tripomastigotes metacíclicos infecciosos en el intestino posterior (Figura 2) (CDC, 2017).

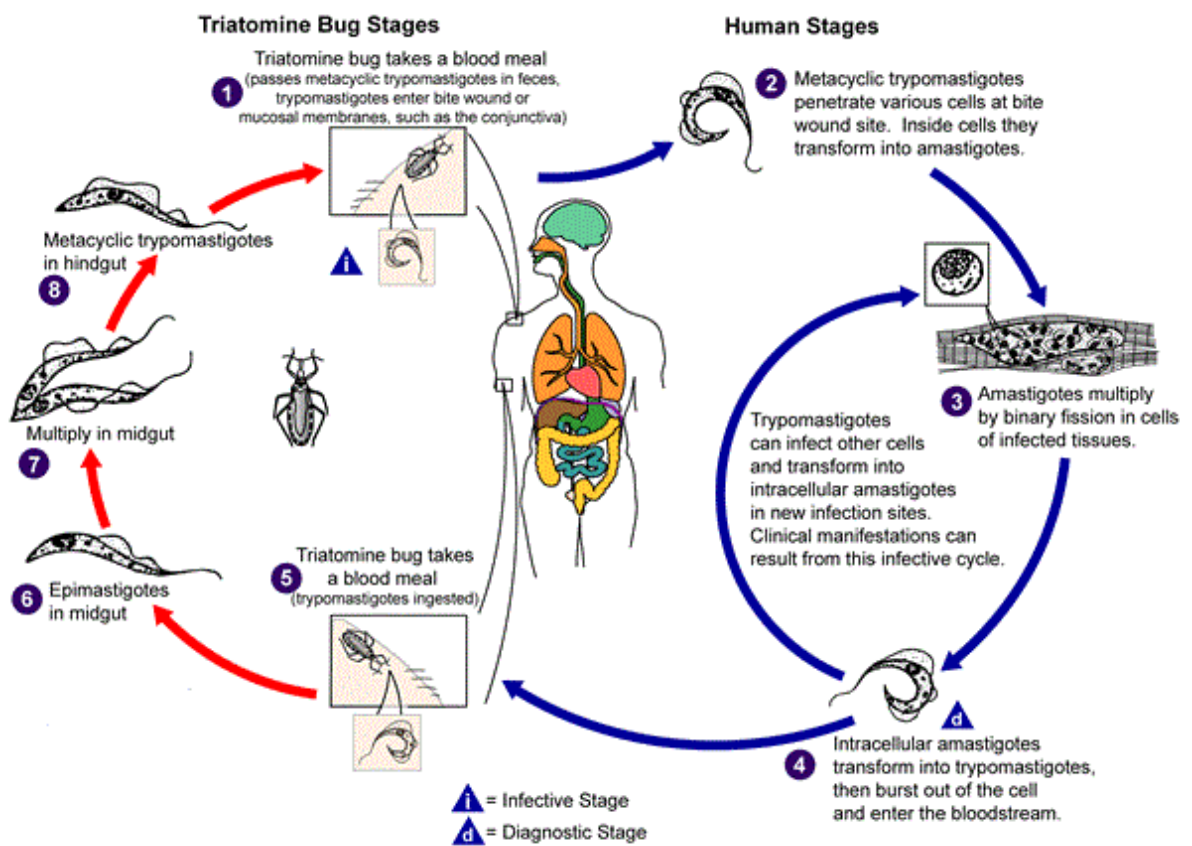


Figura 2. Ciclo de vida de *T. cruzi* (CDC, 2015).

Sintomatología

La manifestación clínica más característica de la enfermedad es la fiebre prolongada, que puede estar asociada con síntomas inespecíficos como postración, diarrea, vómitos, cefalea, mialgia, erupción cutánea y linfadenopatía, que puede estar o no asociada a síntomas específicos como miocarditis aguda, pericarditis aguda, insuficiencia cardíaca aguda, taponamiento cardíaco, derrame pleural, dolor epigástrico, ictericia, hematemesis, hematocezia melena y en algunos casos meningoencefalitis, o frecuente en otros sitios como cara, miembros inferiores o edema generalizado, tos, disnea, dolor torácico, palpitaciones, arritmias, hepatoesplenomegalia (Figura 3) (Rueda *et al.*, 2014).

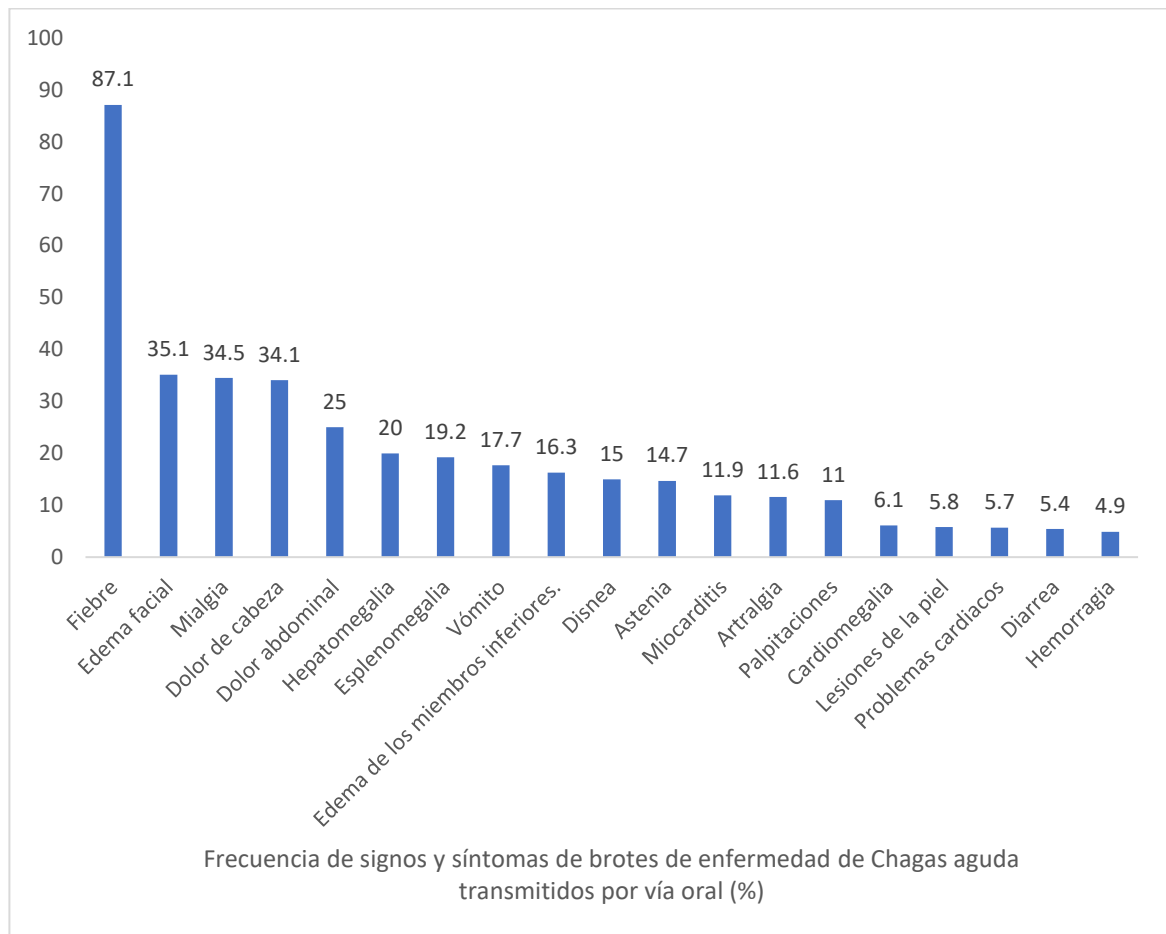


Figura 3. Distribución de signos y síntomas en brotes de la enfermedad de Chagas transmitida oralmente (Alarcón *et al.*, 2016).

Transmisión vectorial

Una de las formas en que *T. cruzi* puede transmitirse es mediante la transmisión vectorial. De las 141 especies descritas, 125 pertenecen exclusivamente a América (Bargues *et al.*, 2010). El principal vector en México es *Rhodnius prolixus*, el cual se consideró eliminado entre 2009 y 2010 (Rojo *et al.*, 2018). Sin embargo, se han detectado 8 géneros y 31 especies de triatoma, entre ellas *Dipetalogaster maxima*, *Triatoma barberi*, *T. dimidiata*, *T. gerstaeckeri*, *T. longipennis*, *T. mazzotti*, *T. mexicana*, *T. pallidipennis*, *T. phyllosoma*, *T. picturata*, *T. recurva*, *T. rubida* y *T. sp.* (Secretaría de Salud, 2015). Especies como *T. gerstaeckeri* y *T. lecticularia* se han aislado en Nuevo León (Martínez *et al.*, 2007).

Vectores en Sur América

Se ha reportado a *Panstrongylus geniculatus* en brotes en Venezuela. También se ha descrito que los principales vectores de transmisión de la enfermedad son *Rhodnius pictipes* y *Panstrongylus geniculatus* en la Cuenca del Amazonas (Alarcón *et al.*, 2016).

En Colombia, *Rhodnius prolixus* y *Triatoma dimidiata* son las principales especies domésticas conocidas por transmitir *T. cruzi*. Sin embargo, se han reportado transmisiones de *T. cruzi* en donde se involucran triatominos invasores domésticos secundarios o no domésticos, como *R. pallescens*, *Eratyrus cuspidatus*, *T. venosa* y *T. maculata*. En Brasil, se han descrito especies como *T. tibiamaculata*, *T. sordida*, *T. braziliensis* y *P. lutzi* (Cantillo *et al.*, 2015; Shikanai y Barbosa, 2012).

Reservorios

Los reservorios naturales de *T. cruzi* son armadillos y marsupiales (de la familia Didelphidae) principalmente, así como roedores, patos, hurones, murciélagos y primates. También se ha reportado casos de mascotas como perros, gatos o inclusive ratas (*Rattus rattus*) (Filigheddu *et al.*, 2017).

Reservorios en Nuevo León

En Nuevo León, México, se han reportado a zorrillos, zarigüeyas o tlacuaches (*Didelphis marsupialis*) y perros como los principales reservorios en esta localidad, así como las ratas de campo (*Neotoma micropus*) (Galaviz-Silva *et al.*, 2017).

Transmisión por transfusiones

La transmisión por transfusiones de sangre es la segunda manera más común de transmisión que existe y tiene un alto riesgo ya que de esta forma podría extenderse a lugares más allá de las áreas endémicas de esta enfermedad, esto es debido a la migración de latinoamericanos hacia otros países en Norteamérica, Europa, Asia y Oceanía (Gascón *et al.*, 2010). En investigaciones realizadas en Europa se ha detectado un 2% de inmigrantes latinos infectados con *T. cruzi* que pueden ser importantes en la transmisión de la enfermedad cuando actúan como donadores de sangre, lo cual se ha demostrado según reportes en Estados Unidos en la década de los ochenta de cinco casos de infección por este protozooario a través de transfusiones sanguíneas, además de que entre 2006 y 2011 se reportaron más de 1,400 casos de donaciones que resultaron ser seropositivas para este parásito (Bern *et al.*, 2011).

Transmisión congénita

La transmisión congénita es común que ocurra en lugares donde la transmisión vectorial y la transmisión por transfusión sanguínea han sido controladas. Se estima una incidencia de más de 15,000 casos al año en países de Latinoamérica como Argentina, Bolivia y Brasil. Además de esto se calcula que en Colombia hay una incidencia anual de 1.04 casos de Chagas congénito por cada 1,000 nacidos, esto quiere decir que hay alrededor de 1,000 casos nuevos de forma anual (Carlier, 2011).

Transmisión vía oral

Existen diferentes formas de transmisión en la vía oral: la primera es por contaminación de alimentos, bebidas (que incluye frutas y jugos) preparados con las heces de triatominos infectados en áreas donde los humanos han invadido el nicho ecológico y donde ocurre el ciclo enzoótico del vector-reservorio o por el consumo directo de los vectores infectados con *T. cruzi* cuando se demostró en animales de laboratorio con la

utilización de triatominos y vectores mecánicos como *Musca domestica* (Alarcón *et al.*, 2015). Otras formas son mediante el consumo de alimentos contaminados con orina o secreciones de glándulas de olor de los marsupiales que tienen lo tripomastigotes metacíclicos del protozoario, por la ingesta de carne cruda o mal cocinada o por el consumo de sangre de animales silvestres durante rituales religiosos o medicina popular en zonas rurales y selváticas del continente (Thomas *et al.*, 2007).

Alimentos asociados

La transmisión generalmente coincide con el clima cálido, ya que es el momento más activo para los triatominos (donde hay una mayor movilidad, hematofagia y contaminación del medio ambiente con heces infectadas) y, según sea la temperatura, la humedad y la desecación, *T. cruzi* puede sobrevivir durante algunas horas o días y a bajas temperaturas su viabilidad puede durar hasta semanas (Rueda *et al.*, 2014).

La contaminación de los alimentos puede ocurrir por el contacto con las heces del vector infectado cuando por malas prácticas de higiene en las materias primas, ya sean accidentes o negligencias, se procesa un alimento que ha sido expuesto a secreciones anales de marsupiales infectados, en cuyo caso deben mantenerse húmedos o parcialmente líquidos para permitir la transmisión del parásito, por lo que se ha asociado con jugo de caña, jugo de frutas, sopa, caldo, leche, agua, carne de caza, entre otros (Parker y Aisa, 2011). Las condiciones en las que se encuentran los alimentos pueden afectar la viabilidad del protozoario, se ha reportado que pueden sobrevivir a temperaturas de 4 °C hasta por 9 horas, o inclusive hasta 12 horas a 5 °C, aunque no más de 2 horas a -20 °C (Shikanai y Barbosa, 2012).

Tipo de jugos de frutas

Se realizó un estudio en Chichiriviche de la Costa, Venezuela, en donde obtuvieron información del consumo de jugos artesanales en una escuela con 83 personas infectadas y 30 no infectadas. Los pacientes positivos consumieron cualquier tipo de jugo que se da en la escuela y lo asociaron con *T. cruzi* en la infección aguda. Cuando los jugos naturales contaminados provenientes de diferentes tipos de frutas son consumidos, se comparan los

consumidores para discriminar si están infectados o no, dentro de los cuales el de guayaba fue estadísticamente relacionado a la enfermedad (Tabla 1) (Alarcón *et al.*, 2016).

Tabla 1. Factores de riesgo en personas con y sin enfermedad de Chagas oral.

Consumo y tipo de jugo	Infección de <i>T. cruzi</i>	
	Infectados (83 personas)	No infectados (30 personas)
Cualquier tipo de fruta	83 (100 %)	23 (76.7 %)
Guayaba	61 (73.5 %)	13 (43.3 %)
Melón	41 (49.4 %)	10 (33.3 %)
Fruta de la pasión	44 (53.0 %)	10 (33.3 %)
Tamarindo	45 (54.2 %)	11 (36.7 %)
Durazno o guanábana	36 (43.4 %)	9 (30.0 %)
Piña	38 (45.8 %)	10 (33.3 %)
Sandía	35 (42.2 %)	8 (26.7 %)
Naranja	36 (43.4 %)	8 (26.7 %)
Papaya	34 (41.01 %)	7 (23.3 %)

Casos clínicos por transmisión oral

La transmisión oral puede ocurrir en zonas rurales y urbanas. En las zonas rurales, la contaminación de alimentos y bebidas por parte de vectores peridomesticados o silvestres carecen de medidas de control. La transmisión oral de la enfermedad de Chagas que ocurre en zonas urbanas se deriva principalmente por triatomíneos infectados que logran llegar a esos lugares debido al transporte mediante fómites, tal como ocurrió en Belén, Brasil (Xavier *et al.*, 2014).

La transmisión oral de *T. cruzi* se ha convertido en la causa más frecuente de casos agudos de enfermedad de Chagas en Brasil y Venezuela principalmente. Entre algunos casos en Venezuela: en el 2007, en Caracas, se observó un tripomastigote en un frotis sanguíneo de una niña, se relacionó el caso con el de una maestra infectada de la misma escuela, por lo que se realizó un tamizaje en 1,000 personas de la escuela, en el que se

incluyen personas a cargo de la preparación de lonches y jugos artesanales, con un resultado de 102 personas infectadas. En 2012, se demostraron tripomastigotes de *T. cruzi* en la sangre de 5 pacientes gravemente afectados asociado con transmisión oral por la ingesta contaminada con *T. cruzi*, ocurrido en la ciudad rural de El Bordo, en donde un adulto murió con miocarditis aguda y se encontró a *Triatoma maculata* y *P. geniculatus* dentro de la casa y *Rhodnius prolixus* y *Eratyrus mucronatus* durante la inspección entomológica de las casas vecinas, en donde *T. cruzi* fue encontrado solamente en *P. geniculatus*. En Mirimire, estado de Falcón, en el 2013, se diagnosticó un caso de enfermedad de Chagas aguda en un muchacho de 16 años el cual estaba hospitalizado en Caracas mientras, la serología fue positiva para *T. cruzi*, observándose una alta parasitemia. Este paciente tenía 8 familiares con síntomas similares, los cuales también fueron diagnosticados con Chagas aguda, mientras que una joven puerperal murió pocos días después de comenzar el tratamiento antiparasitario. La relación entre estos pacientes fue que *P. geniculatus* se recolectó en la casa donde se preparó jugo de mango y se ofreció a estos individuos, incluida la fallecida. En San Cristóbal, estado de Táchira 2014, un brote de enfermedad de Chagas transmitido por vía oral afectó a cinco personas en una familia (1 niño y 4 adultos), de los cuales tres fueron hospitalizados con miocarditis. (Alarcón *et al.*, 2015; Martín *et al.*, 2009; Añez *et al.*, 2013).

En 2005, se registró un brote agudo de Chagas en la zona turística de Santa Caterina, Brasil, tras la ingesta de zumo de caña de azúcar contaminada con restos de chinches o heces de estas y que fue procesado durante la trituración la materia prima. Se confirmaron 25 casos, de los cuales uno fue un turista italiano y 3 personas murieron. En enero de 2010, se reportó otro brote en la región amazónica brasileña de 17 con casos por consumo de açai, y en el mismo mes, pero del 2015, se presentó otro evento con características similares. También se menciona el primer brote de Chagas agudo de transmisión oral en Bolivia ocurrido en octubre de 2010 debido al consumo de majo (*Oenocarpus bataua*), una fruta local cuyo jugo se obtiene por aplastado del producto. Veinticuatro personas fueron expuestas, de las cuales 16 desarrollaron la enfermedad, aunque no hubo muertes. Los signos y síntomas más comunes fueron fiebre y cefalea (100%), seguidos de vómitos, diarrea, esplenomegalia y aumento de las enzimas hepáticas (Steindel *et al.*, 2008; Santalla *et al.*, 2011; Souza *et al.*, 2013).

Diagnóstico

Para realizar un adecuado diagnóstico es necesario realizar una evaluación de la historia epidemiológica del paciente como recorridos recientes, ingesta de alimentos preparados en el hogar sin cocción, etc. Se deben descartar otras enfermedades con síntomas en común como leishmaniosis, malaria, mononucleosis, fiebre tifoidea, toxoplasmosis, hepatitis, hantavirus, leptospirosis, fiebre amarilla, arbovirus (dengue, chikungunya, zika), rickettsiosis, entre otros. Las pruebas de laboratorio incluyen métodos parasitológicos directos en los que se observa el parásito en la sangre y métodos inmunológicos indirectos que detectan anticuerpos específicos. Entre los exámenes directos están el examen directo de la sangre periférica, el cual es rápido, barato y específico, pero no siempre sensible; alternatively, en presencia de síntomas durante más de 30 días, se utilizan métodos de concentración como microhematocrito o el método de Stour. Entre los métodos serológicos se encuentran la hemaglutinación indirecta, la inmunofluorescencia indirecta y el ensayo inmunoabsorbente, los cuales utilizan un antígeno del parásito o extractos solubles; en contraste a estos métodos se encuentran la inmunocromatografía y Western Blot. Los cuales utilizan antígenos recombinantes o péptidos sintéticos. Si en la serología inicial se obtiene un resultado negativo, se vuelve a realizar 3 semanas más tarde y el diagnóstico se confirmaría si hay seroconversión o variación de 3 títulos serológicos por inmunofluorescencia indirecta. El xenodiagnóstico puede utilizarse, aunque no es un método utilizado en Europa, ya que requiere el vector para su realización. El diagnóstico molecular por PCR se utiliza solamente en ciertos centros de salud, pero permite la identificación del parásito en la fase aguda antes de la positividad serológica. Las pruebas más comúnmente utilizadas son el examen directo, la serología por inmunofluorescencia indirecta y el método de inmunoensayo de enzimas (Figura 4) (Díaz y González, 2014; Noya *et al.*, 2015; Filigheddu *et al.*, 2017).

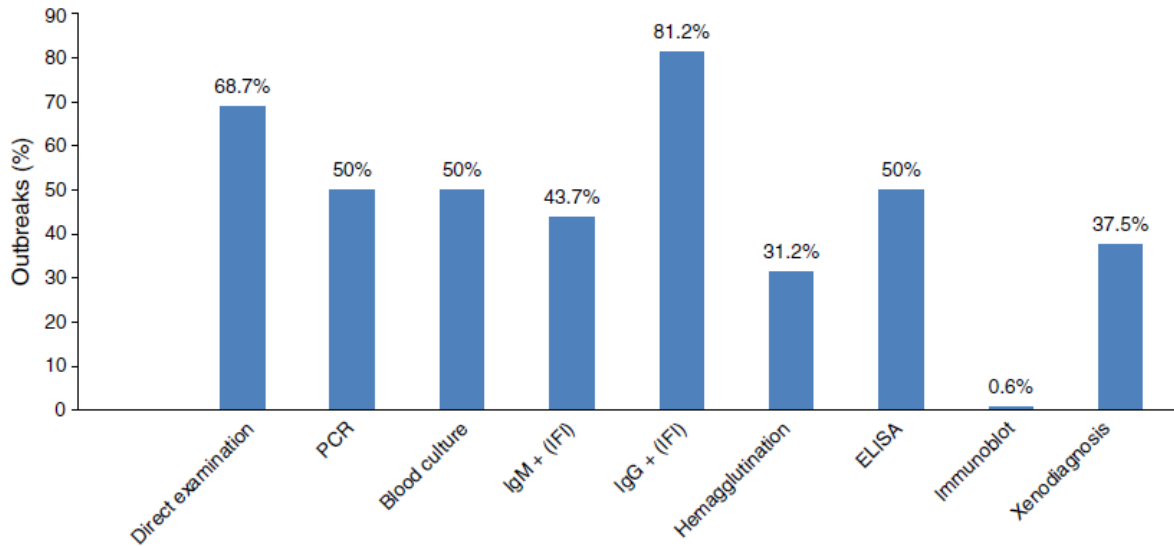


Figura 4. Métodos de diagnóstico utilizados en brotes de enfermedad de Chagas aguda transmitidos por vía oral (Filigheddu *et al.*, 2017).

Tratamiento

El tratamiento específico es estándar para todos los modos de transmisión de *T. cruzi* y debe iniciarse en la etapa aguda. El fin del tratamiento es la prevención del daño a los órganos, así como la reducción de la posibilidad de transmisión. El benznidazol es el fármaco de elección (tabletas de 100 mg) y la dosis varía según la edad y el peso. Se toma por vía oral en 2 dosis diarias durante 60 días (en adultos: 5 mg/kg/día, en niños de 5 a 10 mg/kg/día y en bebés de 10 mg/kg/día). Las reacciones adversas más comunes que pueden ocurrir tras la utilización de los fármacos son enfermedades de la piel, neuropatía, náuseas, vómitos y diarrea. En algunos casos donde las enfermedades o síntomas son leves, el tratamiento se mantiene, en casos moderados, se recomienda interrumpirlo temporalmente, tratar los síntomas y reintroducir gradualmente el medicamento. En caso de que ocurran efectos secundarios graves como ageusia (pérdida completa del gusto) o hipoplasia medular (<1%), el tratamiento debe ser interrumpido (Organización Panamericana de la Salud, 2010).

El fármaco alternativo que se utiliza para el tratamiento es el nifurtimox (comprimidos de 120 mg), cuya dosis también depende de la edad y el peso del paciente, administrados 3 y 4 veces al día durante 90 días (en adultos: 8-10 mg/kg/día y en niños: 15 mg/kg/día). Los efectos secundarios más comunes son anorexia, pérdida de peso,

trastornos psicológicos, irritabilidad, somnolencia, náuseas, vómitos, calambres y diarrea. También se han observado daño a los testículos, toxicidad ovárica y efectos perjudiciales sobre la suprarrenal, el colon, el esófago y el tejido mamario. En ambos fármacos, se han mostrado efectos mutagénicos significativos y resultaron carcinogénicos en algunos estudios. En caso de ocurrir esto, el tratamiento debe posponerse hasta después del primer trimestre. La remisión implica la negatividad serológica, que en la mayoría de los casos ocurre hasta 5 años después del tratamiento, por lo que se recomienda realizar pruebas serológicas (IgG) cada 6 meses o anualmente hasta que 2 pruebas sucesivas no sean reactivas (Bermudez *et al.*, 2016; Castro *et al.*, 2006).

El tratamiento para la enfermedad de Chagas está indicado para la fase aguda y se recomienda para la infección crónica que se adquirió hace menos de 10 años. Estos medicamentos son moderadamente efectivos, logran una curación en el 60 % de los casos en la fase aguda y pueden causar muchas reacciones adversas en los pacientes como hipersensibilidad, depresión de la médula ósea, neuropatías y agranulocitosis (Pereira *et al.*, 2009).

Histotropismo

El miocardio es uno de los tejidos más afectados durante la infección por *T. cruzi* en pacientes, se podría afectar claramente la gravedad de la fase aguda. En las etapas iniciales de la infección (3–9 dpi). Sin embargo, la infiltración inflamatoria fue significativamente mayor en los ratones infectados con GI que en la OI después de 15 ppp, por lo que afecta tanto al pericardio como al miocardio. De conformidad con estudios previos en estos modelos experimentales, los ratones infectados con IP mostraron una infiltración inflamatoria extensa en el corazón a lo largo del curso de la fase aguda (Barreto *et al.*, 2015).

Consumo de jugo de frutas naturales por ratones

Se realizó un estudio en donde analizaron el efecto obtenido de dos variedades de naranja dulce sobre la acumulación de grasa en ratones alimentados con una dieta estándar o una dieta alta en grasas. Para esto, verificaron si el jugo de naranja fue tolerado por las diferentes especies de ratones utilizadas en el experimento. Obtuvieron que los animales

de todas sus cepas lograron tolerar perfectamente el reemplazo de agua potable con jugo de naranja (100% de jugo de naranja, como la única fuente de bebida) y no mostraron ninguna alteración de comportamiento (actividad, interacciones sociales y cuidado personal) (Titta *et al.*, 2010).

JUSTIFICACIÓN

La enfermedad de Chagas por transmisión oral se ha vuelto un problema para algunos países de América Latina debido a que cada vez se reportan más brotes de casos en donde gente es infectada por *T. cruzi* e inclusive ha llegado a haber muertes por infección oral. Se ha estudiado la forma en que se puede transmitir este protozooario por vía oral, de la cual, la principal es por la contaminación de alimentos por el vector y sus heces. Aunque no es la forma de transmisión más común, los efectos que conlleva esta forma resultan ser los mismos que los demás tipos de transmisión. Debido a esto, se probó la sobrevivencia de las formas epimastigotes de *T. cruzi* en jugos naturales de naranja, se determinó la dosis infectiva oral de *T. cruzi* en modelo murino y su comportamiento histopatológico. Por lo cual se determinó si la cepa neolonesa de *T. cruzi* puede ser infectiva vía oral.

HIPÓTESIS

La cepa neolonesa de *T. cruzi* es capaz de sobrevivir en jugos naturales de naranja y mediante infección oral experimental logra causar daños histopatológicos en murinos.

OBJETIVO

Objetivo general

Determinar experimentalmente la dosis infectiva oral de la cepa neolonesa de las formas epimastigotes de *T. cruzi* en modelos murinos.

Objetivos específicos

- Obtener el pH y los grados Brix de jugos naturales de naranja previo a su utilización.
- Medir la sobrevivencia de *T. cruzi* inoculada artificialmente en jugos naturales de naranja.
- Realizar bioensayos en modelos murinos con jugos inoculados con *T. cruzi*.
- Confirmar la infección a nivel murino por la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa punto final.
- Determinar el histotropismo de *T. cruzi* de la cepa de Nuevo León por cortes histológicos y microscopía de luz en órganos de animales infectados experimentalmente.
- Comparar el histotropismo de la cepa Brener internacional de *T. cruzi* (control positivo) con la cepa regional en los ratones infectados experimentalmente mediante cortes histológicos y microscopía de luz.
- Observar formas de amastigotes de *T. cruzi* en tejido infectado mediante la técnica de microscopía electrónica de transmisión.

MATERIAL Y MÉTODOS

Cultivo de la cepa neolonesa de *T. cruzi* en forma epimastigote

Se prepararon tubos con 10 mL de medio infusión de hígado triptona (LIT) para el cultivo de los parásitos en su fase epimastigote hasta la fase exponencial, a una concentración de 5×10^5 parásitos/mL, la cual se determinó mediante el recuento en cámara de Neubauer y expresada en número de parásitos por mililitro de medio (parásitos/mL) para iniciar el experimento (Margioto *et al.*, 2016).

Preparación de jugos naturales

Se prepararon tubos con 9 mL de jugos de fruta a base de naranja en condiciones de esterilidad con ayuda de un tripié y un embudo (que contenía papel filtro Whatman número 1) previamente esterilizado (Figura 5). Los jugos fueron identificados con diferente nomenclatura conforme a las características de cada uno de ellos como se lee en la Tabla 2. Las soluciones S3 y S6 fueron diluidas con agua bidestilada pH 7 estéril (Titta *et al.*, 2011).

Tabla 2. Nomenclatura de soluciones de jugo natural de naranja.

Nomenclatura	Solución	Temperatura
S1	Jugo sin filtrar	28±1 °C (Temperatura óptima de crecimiento)
S2	Jugo filtrado	
S3	Jugo filtrado diluido 1:1	
S4	Jugo sin filtrar	4 °C (Temperatura de refrigeración)
S5	Jugo filtrado	
S6	Jugo filtrado diluido 1:1	



Figura 5. Preparación de jugos naturales de naranja.

A cada solución de jugo se le midió su pH con un Potenciómetro HANNA Hi3220 así como los grados Brix con un Leica Abbe Mark II Plus Refractometer.

Aislamiento de *T. cruzi*

Posteriormente se inocularon vía intraperitoneal ratones macho BALB/c de 20 días de nacido y se obtuvieron los parásitos en 25 días post infección (PI), tiempo en el que se ha observado el incremento del número de parásitos en sangre y a los 90 días se ha observado la fase crónica en ratones. Se extrajo sangre a los ratones y se centrifugó en un equipo Allegra X-12R a 1.500 g para la separación de elementos sanguíneos, el sobrenadante se lavó con PBS (buffer de fosfatos) pH 7.3 y se repitió la centrifugación a 4.500 g; el sedimento fue suspendido en medio LIT y así tener lista la cepa para la realización experimental. Este paso es para mantener la patogenicidad del parásito (Espinoza *et al.*, 2011).

Este proyecto ha sido revisado por el Comité de Ética de Investigación y Bienestar Animal (CEIBA) de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UANL con clave de registro CEIBA-2020-009. Los ratones fueron proporcionados por el bioterio de la FCB-Unidad B, así como manipulados y sacrificados bajo los lineamientos de los principios del uso humano de animales de laboratorio aprobado por la NOM-062-ZOO-1999. Se utilizó una cantidad mínima de ratones para llevar a cabo esta investigación y se minimizó el sufrimiento de estos.

Inoculación de muestras con formas epimastigotes de *T. cruzi*

Se colocó 1 mL del cultivo de epimastigotes ajustado a 5×10^5 parásitos/mL en los tubos con las soluciones de jugo de naranja. Los jugos inoculados se incubaron a temperatura de 28 ± 1 °C (óptima de crecimiento) y en refrigeración a 4 °C durante 24 h, los cuales se observaron cada hora con ayuda de un microscopio óptico LEICA CME Modelo 1349521x y se contaron en una cámara Neubauer para registrar su sobrevivencia en el jugo (Titta *et al.*, 2011).

Suministro de jugos contaminados a roedores

Se suministraron alícuotas de 250 μ L de jugos naturales inoculadas con formas epimastigotes de *T. cruzi* a roedores (libres de algún tratamiento) por vía oral (Tabla 3 y Figura 6), (Camandaroba *et al.*, 2002). Una vez inoculados, los roedores fueron colocados en las jaulas correspondientes de su alojamiento en el bioterio proporcionándoles su mantenimiento durante 36 días hasta que presentaron síntomas de la enfermedad como piel erizada, decaimiento, apatía etc., finalmente fueron sacrificados en la fase crónica de cada grupo experimental (Barreto *et al.*, 2015).

Tabla 3. Nomenclatura de tratamientos en los ratones.

Tratamiento	Tratamiento	Células/mL
1	Control positivo (Cepa internacional Brener)	1.5×10^6
2	Control positivo (Jugo con cepa internacional Brener)	1.5×10^6
3	Control positivo (Cepa de Nuevo León)	1.5×10^6
4	Jugo con cepa de Nuevo León	5×10^4
5	Jugo con cepa de Nuevo León	5×10^5
6	Jugo con cepa de Nuevo León	1.5×10^6
7	Control negativo (Jugo sin inocular)	N.A.
8	Control negativo (sin tratamiento)	N.A.

N.A.: No Aplica.



Figura 6. Suministro de jugo contaminado a roedor.

Observación de tripomastigotes en sangre de ratón en fase aguda

Después de presentar la sintomatología de la fase aguda (7-15 días PI), se cortó la cola de los ratones experimentales de cada grupo 0.5 a 1.0 cm para obtener la sangre (Figura 6), la cual se colocó en un tubo Ependorff de 1 mL de donde se tomaron 10 μ L para observar la parasitemia con un microscopio óptico LEICA CME Modelo 1349521x (Espinoza *et al.*, 2011).



Figura 7. Extracción de sangre contaminada de ratón infectado.

Extracción de ADN en ratones de fase aguda

Para una primera confirmación de la infección y debido a que no se logró a observar los parásitos en microscopia de luz se realizó la extracción de ADN en ratones para luego realizar la amplificación. Con la sangre obtenida de los ratones experimentales, se les realizó la extracción del ADN mediante la técnica del DNAzol para formar una solución que estuviera en una proporción 1:1 en tubo Falcon de 10 mL. La solución se incubó a una temperatura de 4 °C. Se le adicionó cloroformo a una proporción de 1:2 y se mezcló, dicha mezcla se incubó a temperatura ambiente durante 5 min. Después de esto, se transfirió el sobrenadante en un tubo nuevo y se agregó etanol puro frío hasta estar en una proporción 1:1. Se mezcló por inversión y se incubó a temperatura ambiente durante 15 min. Posteriormente se realizó una centrifugación al tubo a 5,000 rpm durante 5 min para después decantar el sobrenadante (Galaviz-Silva *et al.*, 2013).

Se realizó una centrifugación al tubo a 5,000 rpm durante 5 min y se decantó el sobrenadante. Una vez obtenido el pellet, se agregaron 300 µL de etanol 70 % frío y se mezcló para después volver a centrifugar a 5,000 rpm durante 5 min y decantar. Se dejó secar el exceso que hubiera quedado de alcohol del tubo a temperatura ambiente durante 15 min aproximadamente. Se agregaron 100 µL de agua libre de nucleasas y se resuspendió el ADN extraído para después almacenarse a -4 °C hasta su análisis. En cuanto al control positivo se utilizó ADN de forma de epimastigote de *T. cruzi* obtenido del medio de cultivo LIT. Esto se realizó en ambos casos (Pérez-Treviño, 2013).

Confirmación molecular por técnica de PCR

Para la amplificación del gen del mini exón se utilizaron dos oligonucleótidos, uno para upstream y otro para downstream, los cuales fueron TC1: 5'-GTGTCCGCCACCTCCTTCGGGCC-3' y TCC: 5'-CCCCCTCCCAGGCCACACTG-3' respectivamente. La amplificación se realizó con un termociclador (Labnet, MA, USA). La reacción se llevó a cabo en un volumen final de 20 µL, los cuales contenían 5 µL de Buffer MyTaq 5X, 1.2 µL de cada primer (10 µM), 0.2 µL del Taq Polimerasa (QIAGEN, MA) y 2 µL del ADN (80-100 ng). El programa del perfil térmico consistió en una

desnaturalización a 94°C durante 3 min, 40-45 ciclos de amplificación a 94 °C durante 30 s, 58 °C durante 30 s y 72 °C durante 30 s, además de una extensión terminal a 72 °C durante 10 min.

Se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1.5 % y como solución tampón TAE (Tris 40 mM, acetato 40 mM, EDTA 1 mM) en presencia de 0.5 g/mL de bromuro de etidio (Montes *et al.*, 2016).

Confirmación histopatológica

Para una segunda confirmación de la infección, los ratones infectados (30 días PI) fueron anestesiados intramuscularmente e inyectados con ketamine (100 mg/kg of body weight; Fort Dodge Laboratories, Inc., Fort Dodge, IA, USA) y se realizó una eutanasia por una inyección una sobredosis de pentobarbital sódico (Butler Company, Columbus, OH) seguido de una exanguinación clof (Montes *et al.*, 2016).

Se colectó 1 cm³ aproximadamente de órganos presuntamente infectados como esófago, estómago, intestino delgado, colon, corazón y cerebro de los ratones sacrificados. Éstos fueron fijados en un tubo con 9 mL con solución formaldehído al 10 %. Los tejidos ya fijados se enviaron al Laboratorio de Análisis en Sanidad Acuícola del Instituto Tecnológico de Sonora (ITSON) para su procesamiento (Espinoza *et al.*, 2011).

Microscopía electrónica de transmisión (MET)

Para obtener una segunda confirmación de la infección, se colectó 1 mm³ aproximadamente de órganos presuntamente infectados, los cuales fueron esófago, estómago, intestino delgado, colon, corazón y cerebro de los ratones sacrificados. Éstos fueron fijados en un frasco ámbar con 0.9 mL de solución de glutaraldehído al 2.5 %. Los tejidos ya fijados se enviaron a la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) para su procesamiento (de Souza, 2008).

Análisis estadístico

Los datos que se obtuvieron fueron analizados estadísticamente con el programa SPSS 18.0. Se realizó un análisis de varianza mediante la prueba de Tukey para determinar si hubo diferencia significativa entre los tratamientos con los jugos y con los grupos (Titta *et al.*, 2010).

RESULTADOS

Preparación de jugos naturales

Se obtuvo un pH promedio de las soluciones de 4.35. Asimismo, se obtuvieron los grados Brix permaneciendo en un rango de 13 en las soluciones de jugo normal y filtrado, pero de 6 en filtrado diluido (Tabla 4).

Tabla 4. Grados Brix de las soluciones de jugos naturales.

Tipo de jugo	Grados Brix	
	Repeticiones	Promedio
Jugo normal	13.4	13.3666667
	13.4	
	13.3	
Jugo filtrado	13.2	13.4333333
	13.5	
	13.6	
Jugo filtrado diluido	6.9	6.9
	6.9	
	6.9	

Inoculación de muestras con formas epimastigotes de *T. cruzi*

Trypanosoma cruzi logró sobrevivir después de 21 h a la exposición de jugo natural de naranja sin filtrar (Figura 8), filtrado y filtrado diluido, en donde se obtuvo una mayor concentración células/mL en el jugo sin filtrar (Tabla 1, 2 y Figura 9).

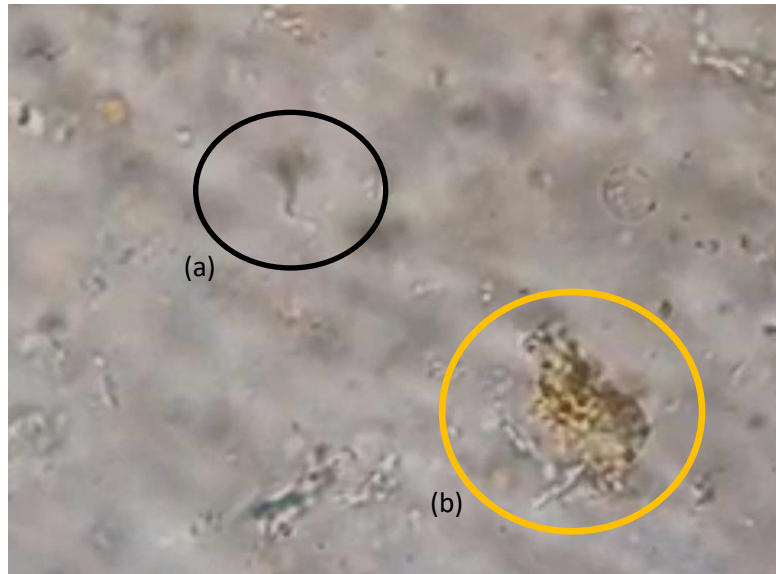


Figura 8. Sobrevivencia de formas epimastigote de *T. cruzi* en jugo de naranja. (a) Célula de *T. cruzi*. (b) Resto de pulpa de naranja.

Tabla 5. Supervivencia de formas epimastigotes de *T. cruzi* en jugo natural de naranja a temperatura óptima de crecimiento (28±1 °C).

Horas	Células de <i>T. cruzi</i> /mL		
	Jugo sin filtrar	Jugo filtrado	Jugo filtrado diluido
0	50,000	50,000	50,000
3	48,000	45,000	40,000
6	30,000	27,000	26,000
9	17,000	13,000	11,000
12	9,000	7,000	4,000
15	3,000	1,500	1,000
18	800	500	400
21	40	30	20
24	0	0	0

Tabla 6. Supervivencia de formas epimastigotes de *T. cruzi* en jugo natural de naranja a temperatura de refrigeración (4 °C).

Horas	Células de <i>T. cruzi</i> /mL		
	Jugo sin filtrar	Jugo filtrado	Jugo filtrado diluido
0	50,000	50,000	50,000
3	46,000	40,000	39,000
6	28,000	26,000	24,500
9	16,600	12,000	11,000
12	7,000	6,500	3,000
15	3,500	1,200	900
18	600	300	150
21	25	18	10
24	0	0	0

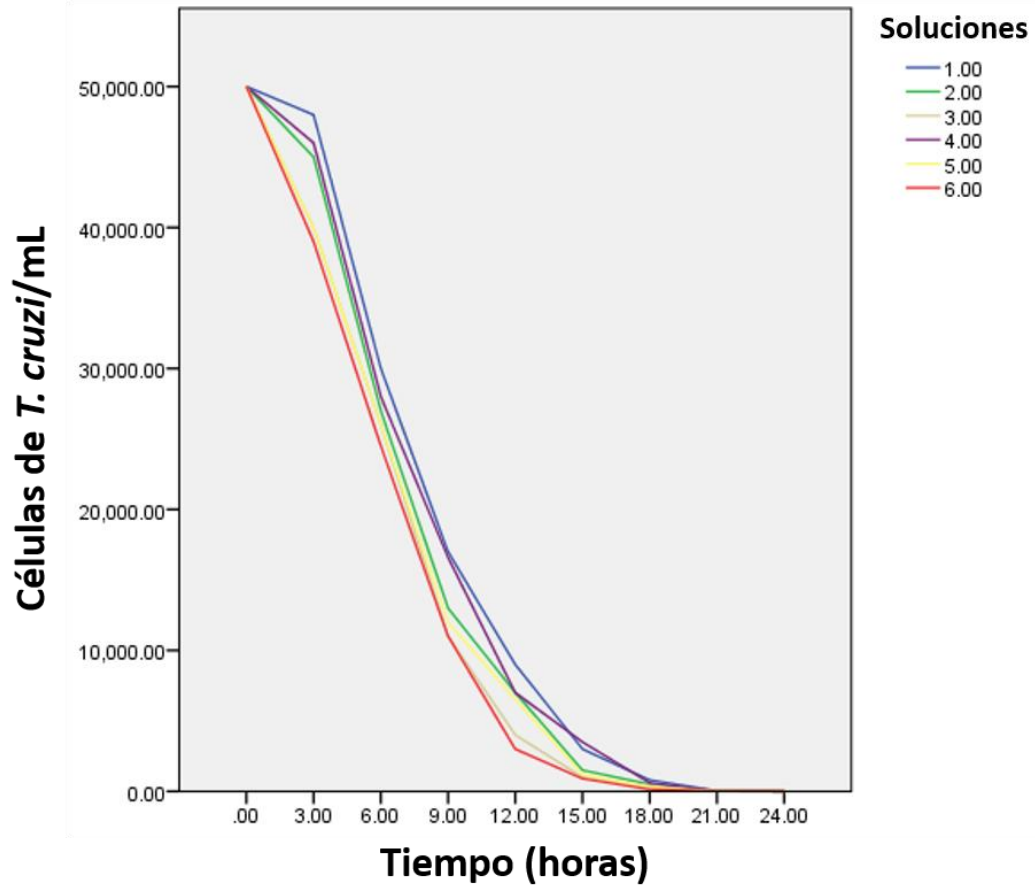


Figura 9. Sobrevivencia de formas epimastigotes de *T. cruzi* en jugo natural de naranja con diferentes soluciones (Ver Tabla 2).

Suministro de jugos contaminados a roedores

Al suministrar los jugos contaminados a los roedores, el ratón del tratamiento 1 murió a los 12 días PI, mientras que el del tratamiento 6 murió al día 18 (Figura 10).

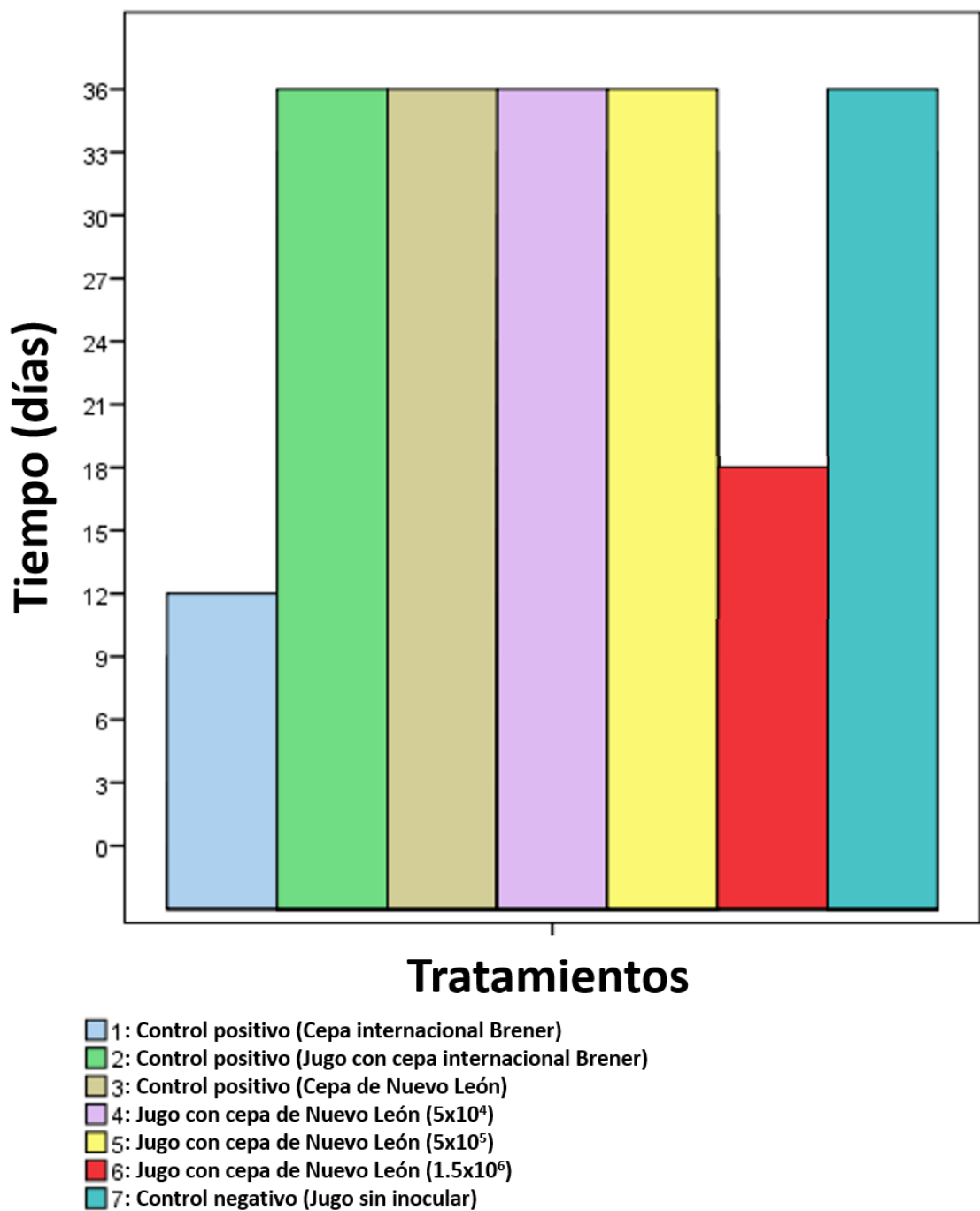


Figura 10. Sobrevivencia de ratones con diferentes tratamientos.

Confirmación molecular por técnica de PCR

Después de realizar la PCR a partir del ADN extraído de la sangre obtenida de los roedores infectados se obtuvo una amplificación de los genes. Se obtuvo una amplificación de 300 pb para el control positivo, así como de 300 y 350 pb para la cepa Brener y alrededor de 200 pb para la cepa de Nuevo León como control y del tratamiento 6. De igual manera no hubo amplificación para los tratamientos 4, 5 y el control negativo (Figura 11).

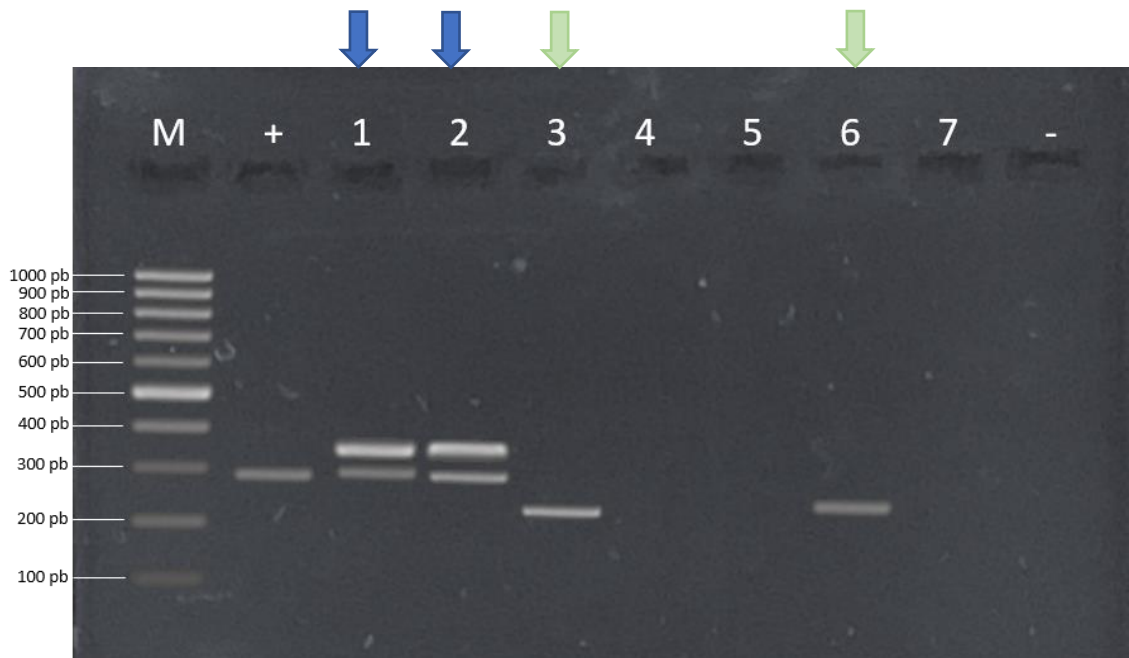


Figura 11. Amplificación de gen mini exón de *T. cruzi* en los tratamientos realizados.

Tabla 7. Nomenclatura de la amplificación por la técnica de PCR.

Carril	Corresponde
M	Marcador
+	Control positivo
1	Tratamiento 1 (Cepa internacional Brener)
2	Tratamiento 2 (Jugo con cepa internacional Brener)
3	Tratamiento 3 (Cepa de Nuevo León)
4	Tratamiento 4 (Jugo con cepa de Nuevo León – 5×10^4 células/mL)
5	Tratamiento 5 (Jugo con cepa de Nuevo León – 5×10^5 células/mL)
6	Tratamiento 6 (Jugo con cepa de Nuevo León – 1.5×10^6 células/mL)
7	Tratamiento 7 (Jugo sin inocular)
-	Control negativo

Confirmación histopatológica

Una vez realizados los cortes histológicos se lograron observar nidos de amastigotes de *T. cruzi* en sistema digestivo (Figuras 12 a 21), por lo que se logró confirmar la infección vía oral.



Figura 12. Nidos de amastigote en tejido de esófago del tratamiento 6 (100X).

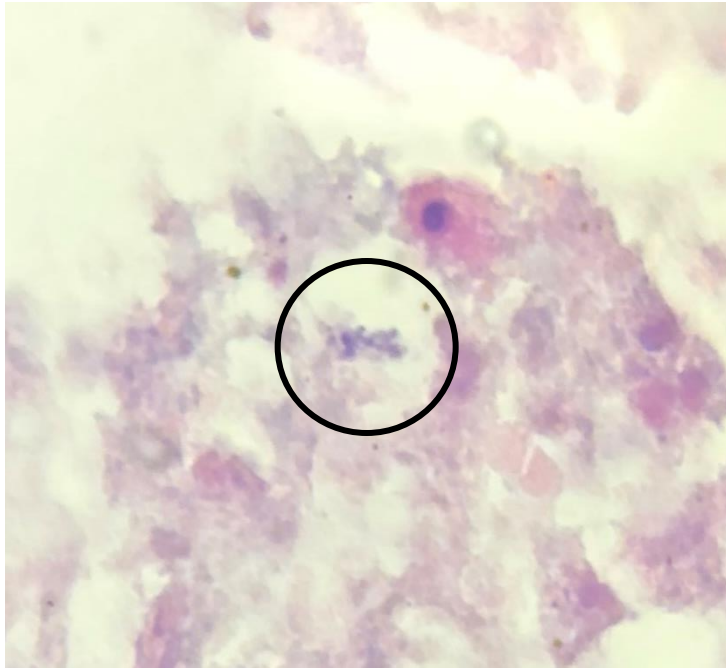


Figura 13. Nidos de amastigote en tejido de intestino del control positivo cepa internacional Brener (100X).

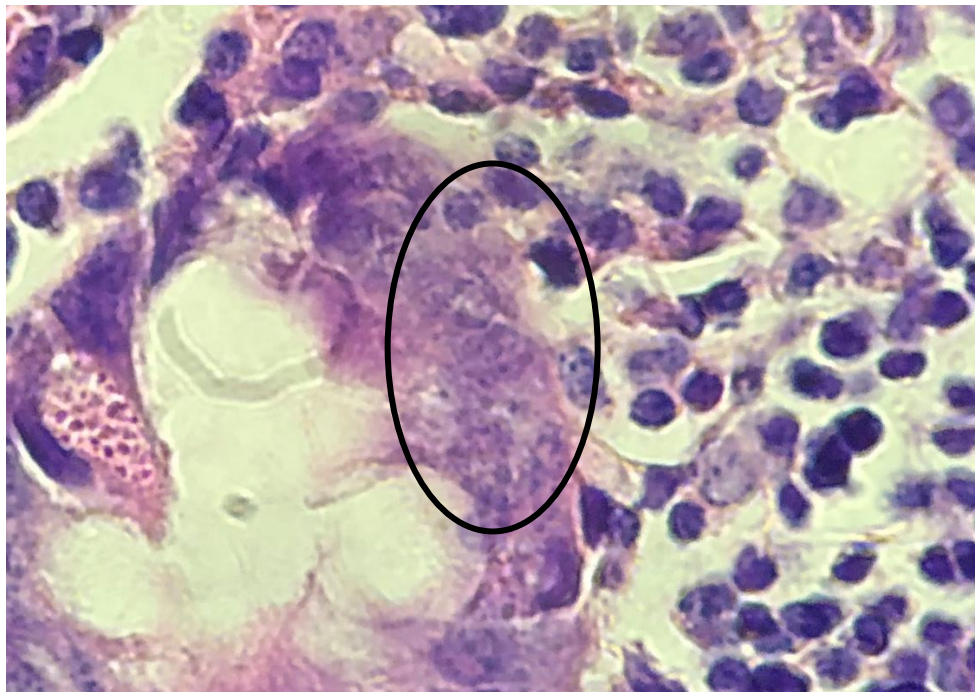


Figura 14. Nidos de amastigote en tejido de intestino del tratamiento 6 (100X).

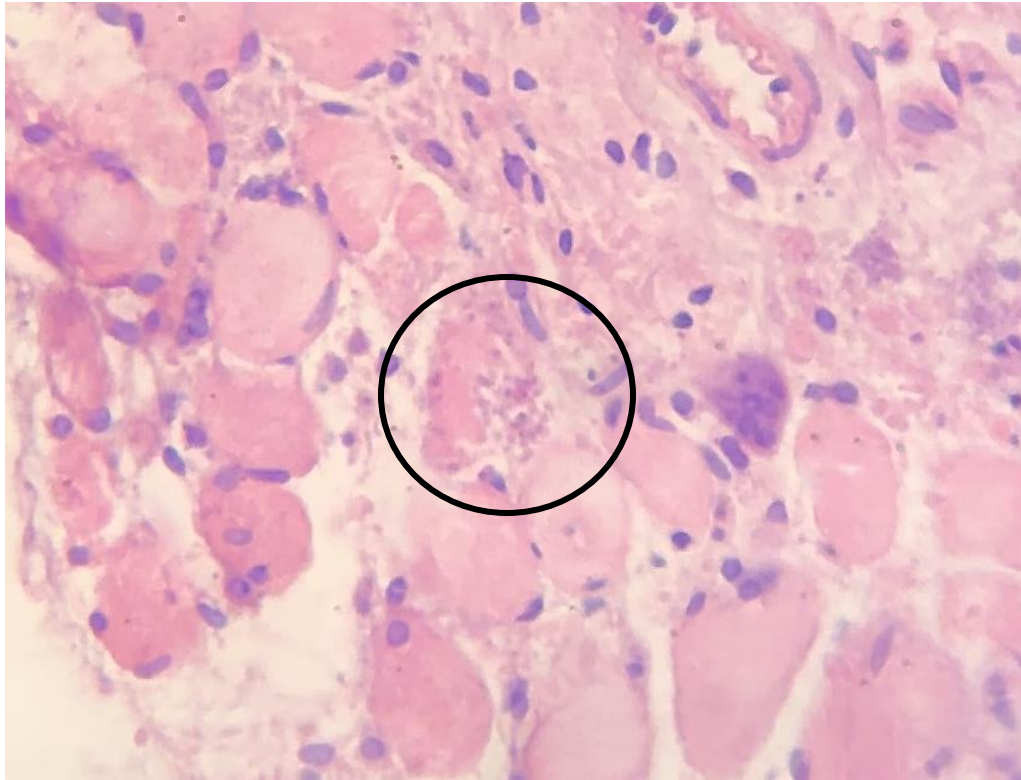


Figura 15. Nidos de amastigote en tejido de intestino del tratamiento 6 (100X).

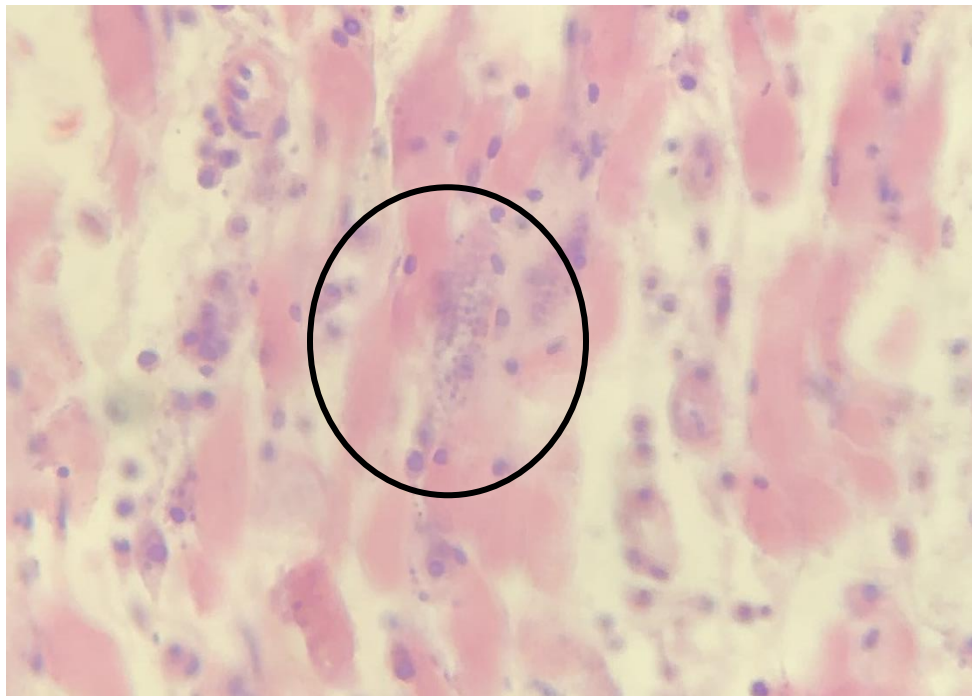


Figura 16. Nidos de amastigote en tejido de intestino del tratamiento 6 (100X).

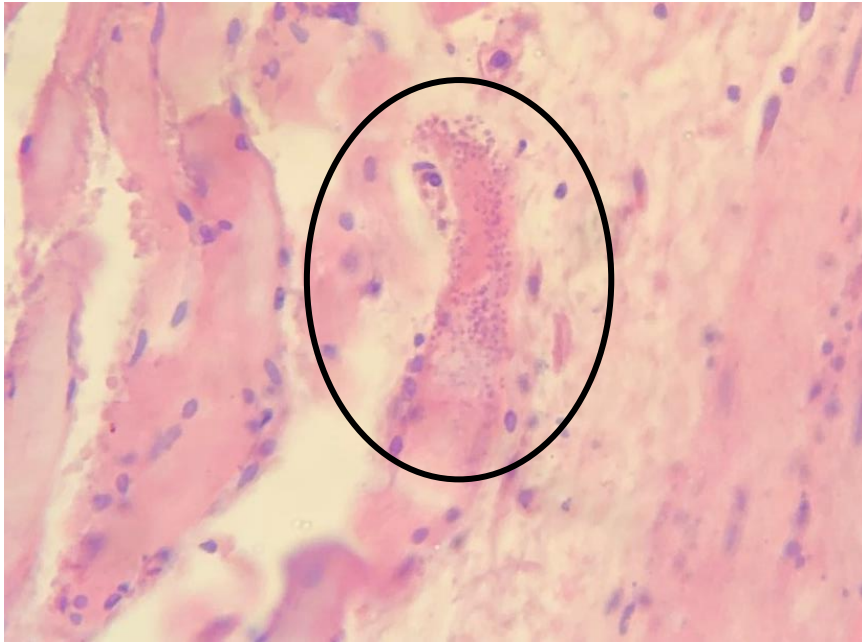


Figura 17. Nidos de amastigote en tejido de intestino del tratamiento 6 (100X).

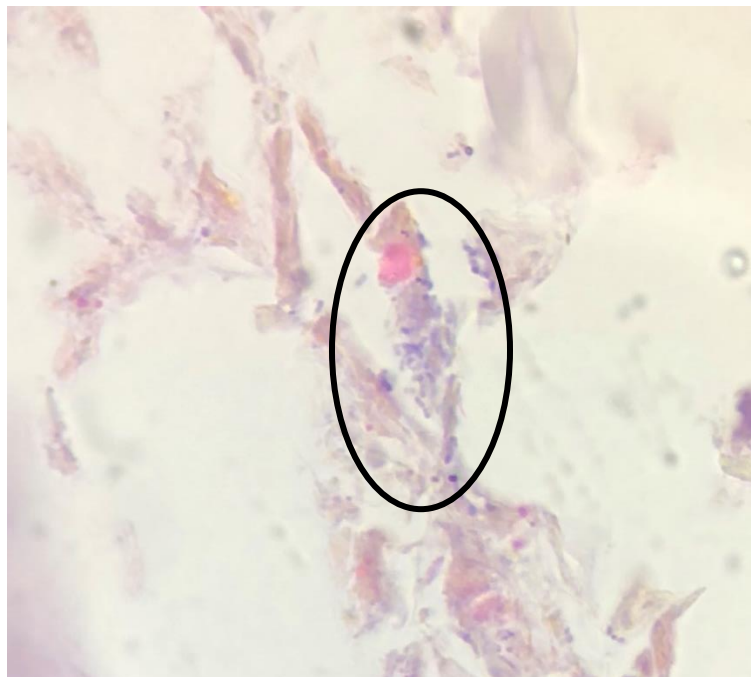


Figura 18. Nidos de amastigote en tejido de colon del control positivo jugo con cepa Brener (100X).

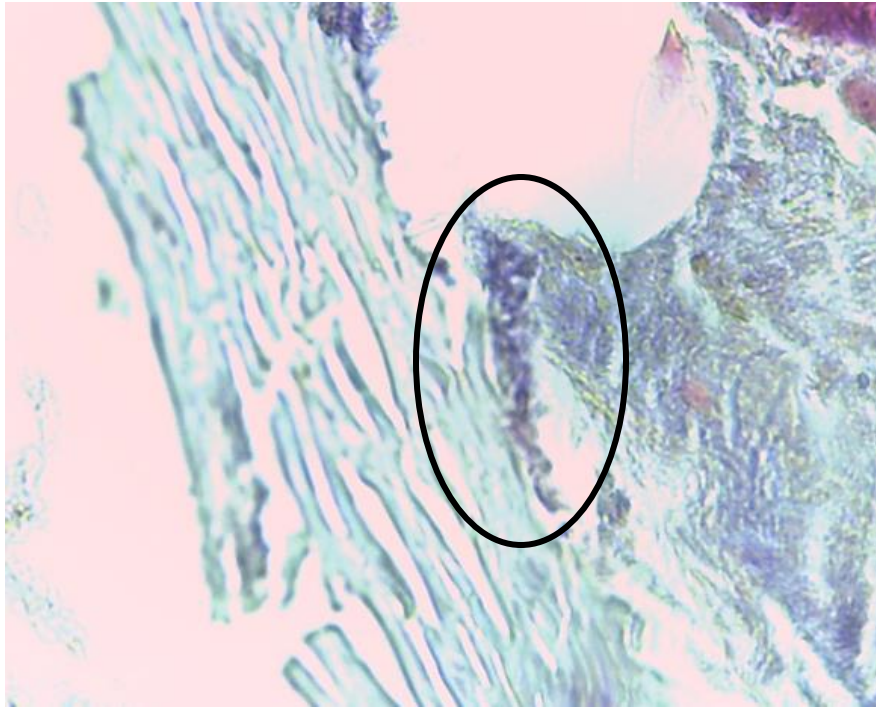


Figura 19. Nidos de amastigote en tejido de colon del tratamiento 3 (100X).



Figura 20. Nidos de amastigote en tejido de colon del tratamiento 3 (100X).

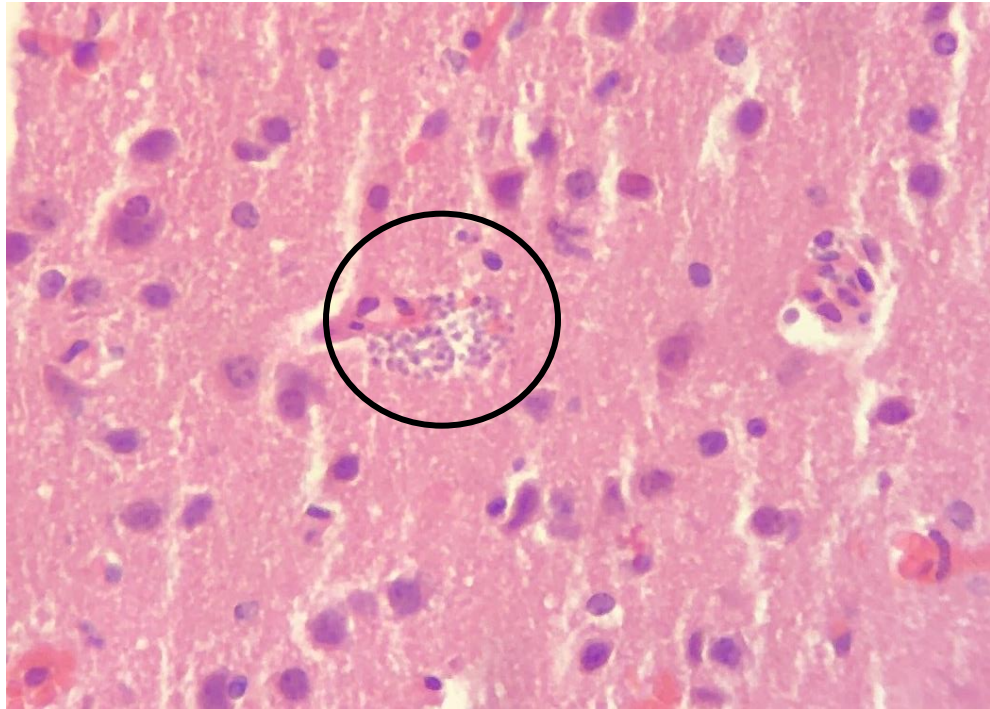


Figura 21. Nidos de amastigote en tejido de colon del tratamiento 6 (100X).

Microscopía electrónica de transmisión (MET)

La observación de los tejidos mediante MET constató la presencia de alteraciones graves en las células de colon y en donde se visualizaban las formas amastigotes (Figuras 22 a 25).

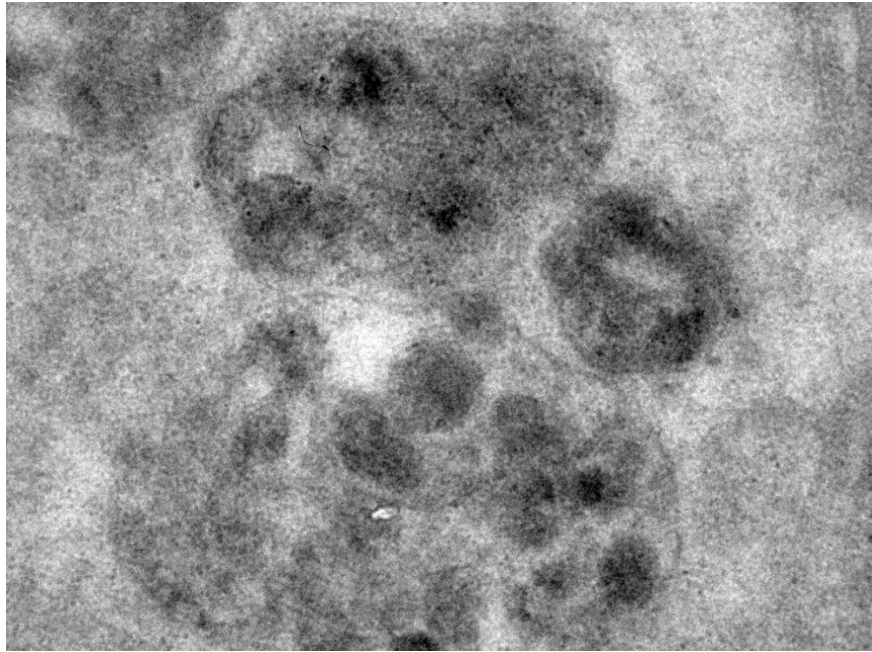


Figura 22. Amastigote en tejido de intestino del tratamiento 6.



Figura 23. Amastigote en tejido de intestino del tratamiento 6.

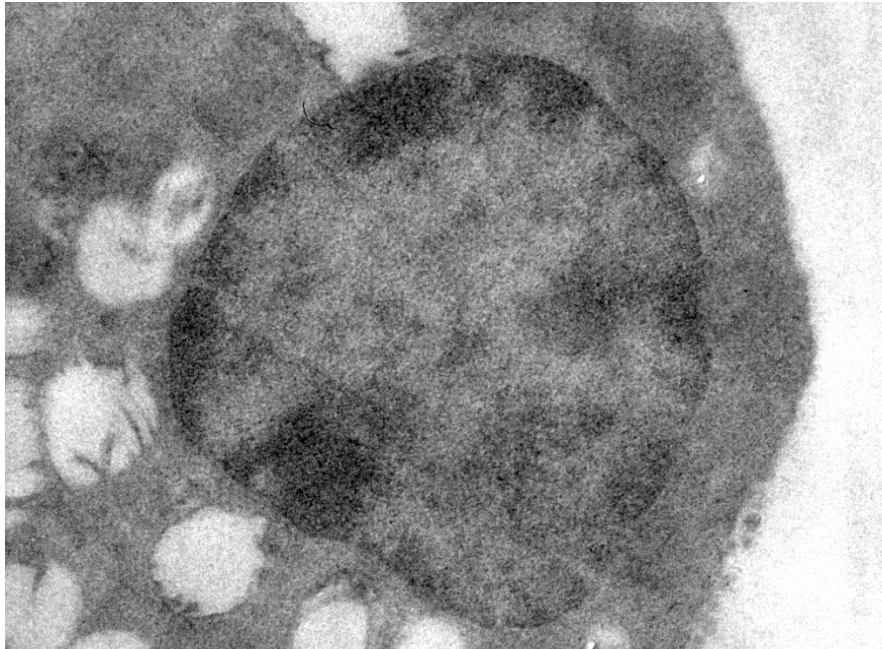


Figura 24. Amastigote en tejido de colon del tratamiento 6.



Figura 25. Amastigote en tejido de colon del tratamiento 6.

Análisis estadístico

Después de realizar un análisis de varianzas de los valores obtenidos en la sobrevivencia de *T. cruzi* en las diferentes soluciones de jugo de naranja se obtuvo una $F_{cal}=0.038$, por lo que se puede decir que no hay diferencia significativa entre los tratamientos.

DISCUSIÓN

En los últimos años, la enfermedad de Chagas en América Latina ha ido en aumento por infecciones orales, relacionados estos brotes por la ingesta de bebidas y alimentos contaminados; En algunos países supera la mortalidad de esta enfermedad, producida por la picadura de vectores infectados (Barreto *et al.*, 2015; Silva-dos-Santos *et al.*, 2017). En México no se ha registrado ningún brote por ingerir alimentos o bebidas contaminadas, por lo cual el objetivo de este trabajo fue demostrar si la cepa de *T. cruzi* de Nuevo León es capaz de sobrevivir en jugos naturales.

Los jugos utilizados en el ensayo de sobrevivencia de las formas epimastigotes de *T. cruzi* procedían de naranjas en estado de madurez, ya que los valores de pH de las soluciones tenían un promedio de 4.35, los cuales entran en el rango de valores normales que va de 2.9 hasta 4.5 tal como lo menciona Bai *et al.*, (2016); Asimismo, los grados Brix de las soluciones de jugo de naranja utilizados tuvieron en promedio 13.37 en el jugo normal, 13.43 en el filtrado y 6.9 en el diluido 1:1, como los reportados por Timmermans *et al.*, (2011). Por lo que se concluye que las naranjas utilizadas para el ensayo se encontraban en un adecuado estado de madurez.

Las formas epimastigotes de *T. cruzi* lograron sobrevivir a un pH ácido (4.35 en promedio) durante 21 horas de exposición en las diferentes soluciones de jugos naturales, si se compara el pH intracelular de *T. cruzi*, este es más neutro: 7.33-7.35 (Van Der Heyden y Docampo, 2000), de igual forma, en otra investigación la cepa Y y Colombiana lograron sobrevivir en condiciones de un pH de 5 (Tomlinson, 1995), por lo tanto, la cepa neolonesa resistió a la acidez de los jugos y fue capaz de infectar a los roedores en el bioensayo. Se ha descrito la transmisión de este parásito por jugos naturales de diferentes frutas, entre ellos, el de naranja con una sobrevivencia de *T. cruzi* de hasta 12 horas (Thomas *et al.*, 2007; Shikanai y Barbosa, 2012). Las formas epimastigotes de *T. cruzi* de la cepa de Nuevo León en las soluciones de jugo de naranja sobrevivieron a una temperatura de 4 °C, lo cual demuestra que el parásito resiste temperaturas bajas, diferentes a las de su rango óptimo. Esto puede ser debido a que, aunque *T. cruzi* no es un

parásito fitófago, la transmisión generalmente coincide con el clima cálido, el momento más activo para los triatominos debido a las temperaturas altas de hasta 40 °C y humedad de 60 %, el protozoario puede sobrevivir durante algunas horas o días a bajas temperaturas y su viabilidad puede durar hasta semanas (Rueda *et al.*, 2014; González-Rete *et al.*, 2019).

Todos los roedores utilizados en esta investigación lograron sobrevivir después de la inoculación de la cepa de Nuevo León con jugo de naranja, a excepción del tratamiento 6, el cual murió a los 18 días PI ya que se utilizó una concentración mayor de parásitos (1.5×10^6). Comparado con otras cepas como la Ninoa y la Querétaro, la inoculación intraperitoneal de los roedores fue de 1×10^4 - 1×10^5 células/mL, la cual es una concentración menor que la del ensayo realizado, y la sobrevivencia de los ratones fue de 40 y 60 días respectivamente (Espinoza *et al.*, 2010). Cortez *et al.*, (2006) reportan que la vía de administración oral tiene una tasa de mortalidad menor a la peritoneal, esto explica la sobrevivencia de los ratones utilizados en el bioensayo.

No se observó la parasitemia por microscopía de luz en la fase aguda (10-14 días PI), ya que *T. cruzi* puede llegar a infectar tejido de esófago, intestino, células adiposas etc., a partir del día 15 PI según lo reportado por Espinoza *et al.*, (2011), sin embargo, en la PCR se obtuvo una muestra positiva, la cual es de 1.5×10^6 células/mL (concentración mayor), además de los controles positivos de la cepa Brener al observarse amplificación en las bandas de 200 y 300-350 pb respectivamente. Se ha reportado la cepa Brener como híbrida, por lo que presenta bandas de 300 y 350 pb (Machado y Ayala, 2001), así como 200-250 pb para la cepa de Nuevo León (Pérez, 2013), lo cual coincide con los resultados obtenidos en la PCR.

Por histología se observaron los nidos de amastigotes en esófago, intestino y colon de los ratones infectados que murieron a los 12 y 18 días PI, así como los sacrificados a los 30 días (Figuras 12-15, 17-21) tal como mencionan Camandaroba *et al.*, (2002), quienes observaron al parásito en tejido del tubo gástrico de ratones infectados. De igual forma, por MET, se observaron amastigotes en tracto digestivo de los ratones infectados (Figuras 22-25). Se ha descrito previamente la infección de *T. cruzi* en roedores donde se

describe claramente el kinetoplasto, el núcleo, la organización general de la forma amastigote del parásito (Santa-Rita, 2006; de Souza, 2009).

CONCLUSIÓN

Se midió la sobrevivencia de formas epimastigotes de *T. cruzi* inoculada en jugos naturales de naranja, de la cual sobrevivió a la acidez y las condiciones de azúcares de este cítrico, por lo que podría realizarse el mismo estudio para diferentes tipos de frutas o alimentos. En este ensayo no hubo diferencia significativa en los tratamientos de las soluciones de jugos debido a que F_{cal} es <0.5 .

Después de realizar los ensayos *in vivo*, se logró determinar la dosis infectiva oral de la cepa neolonesa de *T. cruzi*, la cual es de 1.5×10^6 células/mL, lo que puede dar nuevas perspectivas a la utilización de ésta para distintos ensayos.

Trypanosoma cruzi posee un histotropismo hacía el tejido intestinal después de dos semanas PI oral, como se observó en los cortes histológicos e imágenes de MET en donde se observaron nidos de amastigotes de este parásito.

Se concluye de esta manera que la cepa de Nuevo León de *T. cruzi* es capaz de infectar al humano por alimentos contaminados, por lo cual se recomienda tener más vigilancia y control con los vectores ya descritos en el estado, además de concientizar a la población sobre la Enfermedad de Chagas.

PERSPECTIVAS

Podrían realizarse ensayos similares con diferentes tipos de frutos que tengan diferentes valores de pH y azúcar, así como otros alimentos como carne mal cocida con el fin de observar el comportamiento de *T. cruzi* expuesto a estas condiciones.

Con los datos obtenidos y los previamente reportados podrían realizarse ensayos para medir la sobrevivencia del parásito en la superficie de diferentes frutos, tanto de naranja como cualquier otro, con el fin de conocer el comportamiento que tiene después de ser expulsado en las deyecciones del vector.

Se puede probar otras concentraciones de células del parásito/mL para determinar puede ocurrir una infección con valores intermedios a los utilizados en esta investigación.

BIBLIOGRAFÍA

- Alarcón, B., Colmenares, C., Díaz, Z., Ruiz, R., Medina, K., Muñoz, A., Mauriello, L., Cabrera, E., Montiel, L., Losada, S., Martínez, J., Espinosa, R. y Abate, T. 2016. Orally-transmitted Chagas disease: Epidemiological, clinical, serological and molecular outcomes of a school microepidemic in Chichiriviche de la Costa, Venezuela. *Parasite Epidemiology and Control* 1. pp. 188–198.
- Alarcón de Noya, B., Díaz-Bello, Z., Colmenares, C., Ruiz-Guevara, R., Mauriello, L., Muñoz-Calderón, A. y Noya, O. 2015. Update on oral Chagas disease outbreaks in Venezuela: epidemiological, clinical and diagnostic approaches. *Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro*, Vol. 110(3): 377-386.
- Añez, N., Crisante, G., Rojas, A. y Dávila, D. 2013. Acute Chagas disease outbreak of possible oral transmission in Merida, Venezuela. *Bol. Mal. Salud Amb.* Vol. 3(1):1-11.
- Bai, J., Baldwin, E. A., McCollum, G., Plotto, A., Manthey, J. A., Widmer, W. W., Luzio, G. y Cameron, R. 2016. Changes in Volatile and Non-Volatile Flavor Chemicals of “Valencia” Orange Juice over the Harvest Seasons. *Foods*; 5(1):4.
- Bargues, M.D., Schofield, C.J., Dujardin, J.P. 2010. Classification and phylogeny of the triatominae. En: Telleria J, Tibayrenc M, editors. *American trypanosomiasis Chagas disease, one hundred years of research*. London: Elsevier. p. 117-48.
- Barreto, H., Silva, D., Pérez, A. R., Berbert, L. R., de Santana, E., Farias, D. A., Moreira, O. C., Roggero, E., de Carvalho, C. E., Jurberg, J., Cotta, V., Bottaso, O., Savino, W. y de Meis, J. 2015. *Trypanosoma cruzi* Infection through the Oral Route Promotes a Severe Infection in Mice: New Disease Form from an Old Infection? *PLOS Neglected Tropical Diseases*.
- Bermudez, J., Davies, C., Simonazzi, A., Real, J. P., Real, J. P. y Palma, S. 2016. Current drug therapy and pharmaceutical challenges for Chagas disease. *Acta Trop.* Vol. 156:1–16.

- Bern, C., Kjos, S., Yabsley, M.J., Montgomery, S.P. 2011. *Trypanosoma cruzi* and Chagas disease in the United States. Clin Microbiol. 24:655-81.
- Camandaroba, E. L., Pinheiro, C., Andrade, S. 2002. Oral Transmission of Chagas Disease: Importance of *Trypanosoma cruzi* Biodeme in the Intra-gastric Experimental Infection. Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo. 44(2):97-103.
- Cantillo, O., Garcés, E., Gómez, A., Cortés, L. A., Pereira, A., Marcet, P., Jansen, A. y Triana, O. 2015. Eco-epidemiological study of an endemic Chagas disease region in northern Colombia reveals the importance of *Triatoma maculata* (Hemiptera: Reduviidae), dogs and *Didelphis marsupialis* in *Trypanosoma cruzi* maintenance. Parasites & Vectors, 8:482.
- Carlier, Y., Torrico, F., Sosa-Estani, S., Russomando, G., Luquetti, A., Freilij, H. 2011. Congenital Chagas disease: Recommendations for diagnosis, treatment and control of newborns, siblings and pregnant women. PLoS Negl Trop Dis.
- Castro, J. A., De Mecca, M. M. y Bartel, L.C. 2006. Toxic side effects of drugs used to treat Chagas' disease (American trypanosomiasis). Hum Exp Toxicol. Vol 25:471–9.
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC). 2015. Parasites - American Trypanosomiasis (also known as Chagas Disease). <https://www.cdc.gov/parasites/chagas/biology.html>
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC). 2017. American Trypanosomiasis. <https://www.cdc.gov/dpdx/trypanosomiasisamerican/index.html>
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC). 2019. American Trypanosomiasis. <https://www.cdc.gov/dpdx/trypanosomiasisamerican/index.html>
- Cortez, M., Silva, M. R., Neira, I., Ferreira, D., Sasso, G. R. S., Luquetti, A., Rassi, A. y Yoshida, N. 2006. *Trypanosoma cruzi* surface molecule gp90 downregulates invasion of gastric mucosal epithelium in orally infected mice. Microbes and Infection 8:36–44.
- Coura, J. R. 2003. Tripanosomose, doença de Chagas. Ciência e Cultura 55:30–33.

- Coura, J.R. 2015. The main sceneries of Chagas disease transmission. The vectors: blood and oral transmissions – a comprehensive review. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 110, 277–282.
- de Souza, W. 1999. A Short Review on the Morphology of *Trypanosoma cruzi*: from 1909 to 1999. Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Vol. 94, Suppl. I: 17-36.
- de Souza, W. 2008. Electron microscopy of trypanosomes - A historical view. Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Vol. 103(4): 313-325.
- de Souza, W. 2009. Structural organization of *Trypanosoma cruzi*. Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Vol. 104(Suppl. I): 89-100.
- Díaz, M. L. y González, C. I. 2014. Enfermedad de Chagas agudo: transmisión oral de *Trypanosoma cruzi* como una vía de transmisión re-emergente. Revista de la Universidad Industrial de Santander. Salud Vol. 46(2).
- Espinoza, B., Rico, T., Sosa, S., Oaxaca, E., Vizcaino-Castillo, A., Caballero, M. L. y Martínez, I. 2010. Mexican *Trypanosoma cruzi* TCI Strains with Different Degrees of Virulence Induce Diverse Humoral and Cellular Immune Responses in a Murine Experimental Infection Model. Journal of Biomedicine and Biotechnology. Vol 2010 ID 890672. pp. 1-10.
- Espinoza, B., Solorzano, N., Vizcaino, A., Martínez, I., Elias, A. L. y Rodríguez, J. A. 2011. Gastrointestinal Infection with Mexican TcI *Trypanosoma cruzi* strains: Different Degrees of Colonization and Diverse Immune Responses. Int. J. Biol. Sci.; 7(9):1357-1370.
- Filigheddu, M. T., Górgolas, M. y Ramos, J. M. 2017. Orally-transmitted Chagas disease. Med Clin. Vol. 148(3):125–131.
- Galaviz-Silva, L., Mercado-Hernández, R., Zárata-Ramos, J. J. y Molina-Garza, Z. J. 2017. Prevalence of *Trypanosoma cruzi* infection in dogs and small mammals in Nuevo León, Mexico. Rev Argent Microbiol. 49(3):216-223.

- Galaviz-Silva, L., Pérez-Treviño, K. C. y Molina-Garza, Z. J. 2013. Distribution of ixodid ticks on dogs in Nuevo León, Mexico, and their association with *Borrelia burgdorferi* sensu lato. *Exp Appl Acarol* 61:491–501.
- Gascón, J., Bern, C., Pinazo, M.J. 2010. Chagas disease in Spain, the United States and other non-endemic countries. *Acta Trop.* 115:22-7.
- González-Rete, B., Salazar-Schettino, P. M., Bucio-Torres, M. I., Córdoba-Aguilar, A. y Cabrera-Bravo, M. 2019. Activity of the prophenoloxidase system and survival of triatomines infected with different *Trypanosoma cruzi* strains under different temperatures: understanding Chagas disease in the face of climate change. *Parasit Vectors.* 12: 219.
- Kohl, L. y Bastin, P. 2005. The Flagellum of Trypanosomes. *A Survey of Cell Biology.* 244; 227-285.
- Machado, C. A. y Ayala, F, J. 2001. Nucleotide sequence provide evidence of genetic exchange among distantly related lineages of *Trypanosoma cruzi*. *Proceedings of the National Academy of Science.* 98 (13): 7396-7401.
- Margioto, A. P., De Abreu, A. P., Abegg, C. P., Gomes, M. L. y De Ornelas M. J. 2016. Outcome of oral infection in mice inoculated with *Trypanosoma cruzi* IV of the Western Brazilian Amazon. *Acta Tropica* 166; 212-217.
- Martín, A., Alarcón, B., Montero, R., Rojas, C., Garrido, E., Ruiz, R. y Díaz, Z. 2009. Epidemia de Chagas agudo adquirido por vía oral en una escuela de Caracas: descripción del caso índice. *Arch Venez Puer Ped* 72: 97-100.
- Martínez, J. A., Alejandre, R., Paredes, E., Martínez, M. A., Solorio, M., Noguera, B., Trujillo, F. y Novelo, M. 2007. Biology of three species of North American Triatominae (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) fed on rabbits. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* Vol 102(8):925-930.
- Montes, L. M., Galaviz, L., González, F. E. y Molina, Z. J. 2016. *Trypanosoma cruzi* seroprevalence in pregnant women and screening by PCR and microhaematocrit in newborns from Guanajuato, Mexico. *Acta Tropica* 164; 100–106.

- NORMA Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio.
- Noya, B., Díaz, Z., Colmenares, C., Ruiz, R., Mauriello, L, y Muñoz, A. 2015. Update on oral Chagas disease outbreaks in Venezuela: epidemiological, clinical and diagnostic approaches. *Mem Inst Oswaldo Cruz*; 110:377–86.
- Organización Panamericana de la Salud. 2010. Guía para la atención clínica integral del paciente con enfermedad de Chagas.
- Parker, E. R. y Aisha, S. 2011. Chagas Disease: Coming to a Place Near You. *Dermatol Clin*; 29: 53–62.
- Pereira, K. S., Schmidt, F. L., Guaraldo, A. M., Franco, R., Días, V., Passos, L. 2009. Chaga's Disease as a Foodborne Illness. *Journal of Food Protection*, Vol. 72, No. 2, Pages 441–446.
- Pérez-Treviño, K. C. 2013. Obtención de la cepa de *Trypanosoma cruzi* a partir de roedores y triatomíneos infectados y su cultivo en condiciones de laboratorio (Tesis de maestría). Facultad de Ciencias Biológicas, UANL.
- Rassi, A., Rassi, A. J., Marin, J. A. 2010. Chagas disease. *Lancet*; 375: 1388–402.
- Rojo, J., Ruiz, C., Salazar P. M. y González, J. F. 2018. Enfermedad de Chagas en México. *Gac Med Mex.*; 154:605-612
- Rueda, K., Trujillo, J. E., Carranza, J. C. y Vallejo, G. A. 2014. Oral transmission of *Trypanosoma cruzi*: a new epidemiological scenario for Chagas' disease in Colombia and other South American countries. *Biomédica*. Vol. 34:631–41.
- Santa-Rita, R. M., Barbosa, H. S. y de Castro, S. L. 2006. Ultrastructural analysis of edelfosine-treated trypomastigotes and amastigotes of *Trypanosoma cruzi*. *Parasitol Res* 100:187-190.
- Santalla, J., Oporto, P., Espinoza, E., Ríos, T. y Brutus, L. 2011. Primer brote reportado de la enfermedad de Chagas en la Amazonía Boliviana: reporte de 14 casos

- agudos por transmisión oral de *Trypanosoma cruzi* en Guayaramerín, Beni-Bolivia. *Biofarbo*; 19:52–8.
- Secretaría de Salud. 2015. Lineamientos Para La Vigilancia Epidemiológica de Chagas Por Laboratorio. INDRE-DGE-Secretaría de Salud.
- Shikanai, M. A. y Barbosa, N. C. 2012. Oral transmission of Chagas disease. *Clin Infect Dis*; 54: 845-852.
- Silva-dos-Santos, D., Barreto-de-Albuquerque, J., Guerra, B., Moreira, O. C., Berbert, L. R., Tavares-Ramos, M., Mascarenhas, B. A. S., Britto, C., Morrot, A., Serra-Villa-Verde, D. M., Ribeiro-Garzoni, L., Savino, W., Cotta-de-Almeida, V. y de Meis, J. 2017. Unraveling Chagas disease transmission through the oral route: Gateways to *Trypanosoma cruzi* infection and target tissues. *PLoS Negl Trop Dis* 11(4): e0005507.
- Steindel, M., Kramer, P. L., Scholl, D., Soares, M., de Moraes, M. H. y Eger, I. 2008. Characterization of *Trypanosoma cruzi* isolated from humans, vectors, and animal reservoirs following an outbreak of acute human Chagas disease in Santa Catarina State, Brazil. *Diagn Microbiol Infect Dis.*; 60:25–32.
- Souza, R. C., Barbosa, M., Coura, J. R., Arcanjo, A. R., Nascimento, A. S. y Ferreira, J. M. 2013. Outbreak of acute Chagas disease associated with oral transmission in the Rio Negro region, Brazilian Amazon. *Rev Soc Bras Med Trop.*; 46:510–4.
- Thomas, M. E., Rasweiler, J. J D'Alessandro, A. 2007. Experimental transmission of the parasitic flagellates *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli* between triatomine bugs or mice and captive Neotropical bats. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 102: 559-565.
- Timmermans, R. A. H., Mastwijk, H. C., Kno, J. J., Quataert, M. C. J., Vervoort, L., Van der Plancken, I., Hendrickx, M. E. y Matser, A. M. 2011. Comparing equivalent thermal, high pressure and pulsed electric field processes for mild pasteurization of orange juice. Part I: Impact on overall quality attributes. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 12(3), 235–243

- Titta, L., Tritnei, M., Stendardo, M., Berniakovich, I., Petroni, K., Tonelli, C., Riso, P., Porrini, M., Minucci, S., Pelicci, P. G., Rapisarda, P., Reforgiato, G. y Giorgio, M. 2010. Blood orange juice inhibits fat accumulation in mice. *International Journal of Obesity*. Vol 34, 578–588.
- Tomlinson, S., Vandekerckhove, F., Frevert, U. y Nussenzweig, V. 1995. The induction of *Trypanosoma cruzi* trypomastigote to amastigote transformation by low pH. *Parasitology*; 5:547-554.
- Van Der Heyden, N. y Docampo, R. 2000. Intracellular pH in mammalian stages of *Trypanosoma cruzi* is K⁺-dependent and regulated by H⁺-ATPases. *Mol Biochem Parasitol*; 105(2):237-251.
- Xavier, S. C. C., Roque, A. L. R., Bilac, D., de Araújo, V. A. L., Neto, S. F. C., da Silva, L. F. C. y Jansen, A. M. 2014. Distantiae transmission of *Trypanosoma cruzi*: a new epidemiological feature of acute Chagas disease in Brazil. *PLoS Negl Trop Dis* 8: e2878.

ANEXO

Carta de autorización de uso de animales experimentales por parte del Comité de Ética de la Facultad de Ciencias Biológicas, UANL.