

Influencia de la inoculación oral en la enfermedad de Chagas en modelo murino

Oral inoculation influence on Chagas disease in a murine model

Oscar A Reboreda-Hernandez¹,  Nayeli Gonzalez-Rodriguez²,  Andrea Rebeca Cruz-Gonzalez³, 
Alan Roman-Cedillo⁴,  Roció Ortiz-Butron⁵ 

DOI: 10.19136/hs.a20n2.4023

Artículo Original

Fecha de recibido: 19 de septiembre de 2020

Fecha de aceptado: 18 de enero de 2021

Autor de Correspondencia:

Rocio Ortiz-Butron. Dirección postal: Prolongación de Carpio y, Calle Plan de Ayala s/n,
Santo Tomás, Miguel Hidalgo, CP. 11340 Ciudad de México, México.
Correo electrónico: dipetalogaster@gmail.com

Resumen

Objetivo: Determinar el comportamiento de la enfermedad de Chagas, comparando la vía de inoculación intraperitoneal (i.p.) y la vía oral (v.o.), mediante la ingestión alimentos infectados con *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*).

Materiales y métodos: En modelo murino, se comparó la parasitemia en la infección adquirida vía i.p. y vía oral. Se formaron dos grupos que fueron inoculados con la cepa NINOA de *T. cruzi* (3x103); uno se administró v.o. y otro, se administró vía i.p. Además, se realizó un estudio histopatológico del tejido cardíaco de los individuos. Finalmente, se determinó y comparó la respuesta inmune montada como resultado de la inoculación por ambas vías, evaluando la concentración de IgG séricas contra *T. cruzi* mediante la realización de una ELISA casera.

Resultados: El comportamiento de la infección fue diferente en ambas vías de inoculación. A través de los métodos parasitológicos e histopatológicos empleados, no fue detectable la infección en aquellos individuos infectados vía oral, interesantemente, la infección sí fue detectable mediante métodos inmunológicos. Aquellos individuos infectados vía oral empleando açaí, tuvieron un comportamiento inmune similar al presentado por aquellos inoculados vía i.p.

Conclusiones: El presente estudio demuestra que la vía de infección del hospedero es determinante para la evolución de la enfermedad. Este trabajo proporciona evidencia para que en la práctica clínica, se realice a los individuos más de una prueba diagnóstica, hecho que, ayudará a un mejor manejo de la enfermedad de Chagas.

Palabras clave: Enfermedad de Chagas, Brotes, *Trypanosoma cruzi*.

Abstract

Objective: Determine the behavior of Chagas's disease, comparing the intraperitoneal (i.p.), and the oral (v.o.) administration routes, by the ingestion of *T. cruzi*-contaminated food.

Materials and methods: In mice, parasitemia oral and intraperitoneal acquiring routes were compared. Two groups were inoculated with *T. cruzi* (3x103) NINOA strain: one orally, and another intraperitoneally. Additionally, a heart tissue histopathologic analysis was performed. Finally, the immune response triggered by both inoculation routes was determined by a homemade ELISA and compared.

Results: The infection behavior was different in each inoculation route. In the orally infected group, infection was undetectable by parasitological, and histopathologic methods; interestingly, infection was detected by immune methods. Orally infected individuals using açaí behaved similarly to intraperitoneally inoculated ones.

Discussion: The vector and hosts close coexistence promote several infection routes. To improve the diagnosis, disease's course variants knowledge is needed.

Conclusion: This study shows that the infection route strongly influences Chagas's disease course. Moreover, this work provides evidence that support the fact of doing more than one diagnostic test, improving the disease management.

Key words: Chagas Disease, outbreak *Trypanosoma cruzi*.

1. Maestro en Ciencias Químico-biológicas, Laboratorio de Patología, Departamento de Morfología, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional, Ciudad de México, México.

2. Doctora en Ciencias Químico-biológicas, Profesora Investigadora, Laboratorio de Patología, Departamento de Morfología, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional, Ciudad de México, México. 3. Químico Bacteriólogo Parasitólogo, Laboratorio de Patología, Departamento de Morfología, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional, Ciudad de México, México.

4. Químico Bacteriólogo Parasitólogo, Departamento de Fisiología, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional, Ciudad de México, México.

5. Doctora en Fisiología, Profesora Investigadora, Departamento de Fisiología, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional, Ciudad de México, México.

Introducción

La infección por *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*) usualmente se transmite mediante la vía vectorial; actualmente, se calcula que la vía de transmisión vectorial es responsable del 50% de los casos en la Rivera del Amazonas¹, sin embargo, hay otras vías que han sido reportadas, pero poco estudiadas, tal es el caso de la vía oral.

La infección con *T. cruzi* tuvo su origen como una infección zoonótica²; ruta que permite que haya hospederos silvestres y sirvan de reservorios. El problema es que a medida que los humanos invaden la naturaleza, debido al llamado “efecto dilutorio”³, también se aproximan a las áreas en las que se encuentran los reservorios y los transmisores de *T. cruzi*⁴, lo que permite que el parásito se transmita a los humanos, mediante la ingestión de las deyecciones de los insectos triatomínicos, si este defeca al picar cerca de las comisuras de los labios, acción que le da el nombre pintoresco de “chinche besucona” (vía vectorial), los triatomínicos mismos o la carne de animales infectados (vía oral)⁵.

Respecto a la vía oral, se han reportado varios brotes ocurridos en regiones endémicas⁶, caso en los que ha sido relacionada con un peor pronóstico para los enfermos⁷ relacionados con diversos alimentos e incluso, ha sido reproducida a nivel laboratorio, en países en los que se han tenido reportes de brotes por ingesta del parásito⁸. El problema estriba en que la fase infectante para los mamíferos es muy frágil al medioambiente, por lo que es interesante conocer el comportamiento de la enfermedad dependiendo la vía de inoculación, esto al conocer el tiempo en el que estén viables en el ambiente para infectar mediante la vía oral (v.o.) con el fin de sugerir estrategias de prevención y control de esta infección. Tomando como base los alimentos mencionados en trabajos anteriores, hechos en Latinoamérica tabla 1.

Materiales y métodos

Ratones y parásito

Ratones (*Mus musculus*) BALB/c machos sanos de 6-8 semanas y 20-25g fueron obtenidos del bioterio de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas (ENCB), Instituto Politécnico Nacional (IPN). Cada grupo experimental constó de 6 individuos. Los grupos se mantuvieron durante todo el tiempo experimental, bajo un fotoperiodo: 12h de luz/12h de oscuridad¹⁹, en jaulas transparentes de acrílico perfectamente etiquetadas con un tamaño aproximado de 30cm x 15cm x 20cm de área (9 000cm³), a una temperatura de 25±2°C y a una humedad relativa de 50-70%, el piso de las jaulas estaba cubierto con aserrín, mismo que se cambió cada dos días. Se les proporcionó alimento en cubos Rat Chow (Nestlé Purina, Vevey, Suiza) y agua potable *ad libitum*²⁰.

El presente protocolo experimental fue evaluado y aprobado por el comité de Bioética de la ENCB, IPN CEI-ENCB-009-2017; además, los ratones fueron manipulados siguiendo estrictamente los lineamientos del comité de bioética.

Trypanosoma cruzi cepa NINOA, perteneciente a la unidad discreta de tipificación I (predominante en México)²¹, fue donada y mantenido amablemente por el Dr. Benjamín Noguera, departamento de Parasitología, ENCB, IPN, CDMX.

Alimentos y bebidas

Los alimentos utilizados tabla 1 fueron adquiridos en el mercado “La Merced” que se encuentra en la CDMX, fueron sometidos a desinfección por lavado en el caso de las frutas y los alimentos cocidos (arroz blanco cocido, pan y tortilla), fueron administrados sin tratamiento previo. Los jugos fueron obtenidos por proceso mecánico mediante un extractor de jugos T-fal ZE550DMX (Groupe SEB, Rumilly, Francia).

Tabla 1. Brotes de infección de Chagas adquirido vía oral: lugar y comida relacionada con el brote

Comestible relacionado con el brote	País	Referencia
Acaí (fruto y en pasta)	Brasil, Colombia	9,10,11,12
Agua	Brasil	13,14
Arroz	Colombia	11
Jugo de caña de azúcar	Brasil	2,10,15,16
Jugo de guayaba	Venezuela	17
Jugo de mandarina	Colombia	18
Jugo de naranja	Colombia	18

Fuente: Elaboración propia

Evaluación de la viabilidad de *T. cruzi*

Con base a una revisión bibliográfica los alimentos seleccionados para el ensayo tabla 1, fueron inoculados con una solución de 50 µL de PBS con 1×10^3 tripomastigotes metacíclicos de *T. cruzi*, a partir de ese momento, cada 30 segundos, se tomó una muestra y, empleando microscopía óptica de campo claro, se observó la viabilidad del parásito, repitiendo este procedimiento hasta que muriera (perdiera su movimiento característico), este alimento fue inoculado (v.o.) en los ratones tabla 2. Adicionalmente, se realizó una inoculación directa del parásito vía oral.

Infección con *T. cruzi* en modelo murino

Vía oral. Los ratones fueron mantenidos sin alimento por 4 horas, pasado ese periodo se les permitió la ingesta con el alimento o bebida correspondiente²². Como testigo positivo de la infección, se llevó a cabo la inoculación de un grupo vía intraperitoneal (i.p.) con 1×10^3 tripomastigotes metacíclicos/mL.

Curvas de parasitemia y mortalidad en modelo murino

Parasitemia. Se analizó la infección de los ratones mediante observación microscópica de la sangre de los individuos. Desde el día 2 (i.p.) hasta que ya no se detectó parasitemia, se contó el número de parásitos presentes en el torrente circulatorio de los ratones^{23,24}, siguiendo el método de Brener, en el que, de cada individuo, se obtiene 5 µL de sangre de la vena caudal y se determina el número de parásitos empleando la cámara de Neubauer Blaubrand (Merck, Darmstadt, Alemania)²⁵. Las curvas de parasitemia se realizaron por triplicado²⁵.

La mortalidad se registró diariamente²⁶ y se obtuvo la mortalidad acumulada (número de ratones que murieron durante la infección aguda).

Análisis histopatológico

Una vez determinado el pico de parasitemia (empleando el método anterior), un segundo conjunto de ratones se sacrificó en este punto, para obtener los corazones que se procesaron mediante la técnica de inclusión en parafina (se fijaron en formalina, se lavaron, se deshidrataron y se transparentaron para incluirlos en parafina)²⁶.

Posteriormente, se realizaron cortes en secciones de 5-µm empleando un microtomo Thermo Scientific HM325 (Thermo Fischer Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA) para obtener 30 laminillas de cada individuo que después se tiñeron, empleando la técnica de Hematoxilina-Eosina (H-E). De cada laminilla se contaron 6 campos microscópicos,

utilizando un microscopio óptico Nikon-Eclipse 50i (Nikon, Chiyoda, Japón) utilizando un aumento de 40x y se anotaron el número de amastigotes, con el objeto de obtener la cantidad de parásitos^{23,19,26}. Así mismo, se observó y clasificó semicuantitativamente, la presencia de proceso inflamatorio, que se denotó por medio de cruces de la siguiente manera: ausente (-), escaso (en menos del 25 % de los campos) (+), moderado (del 25% al 50% de los campos) (++) y severo (más del 50% de los campos) (+++)¹⁹.

Determinación de la concentración de IgG

De los ratones inoculados vía oral, a partir del día 20 postinoculación, en días alternos, se obtuvo el suero mediante un pequeño corte en la vena caudal de los animales, recolectando la sangre, empleando un tubo capilar con heparina CIVEQ 1292R (VelaQuin, CDMX, México). La sangre extraída fue centrifugada a 10 000 rpm por 5 minutos para la separación del suero, y almacenados en congelación a -20°C Ecoshel 25-166 (VelaQuin, CDMX, México).

Se utilizaron placas de fondo plano Costar (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA) que se sensibilizaron con un extracto crudo de epimastigotes, a una concentración de 10 µg/ml en buffer de carbonato 1mM, pH 9.6 y se incubaron por dos horas a 37 °C. Se descartó el antígeno sobrante y se lavaron las placas con 200 µl de PBST-Tween 20 al 0.05% por tres veces. Posteriormente se bloquearon los sitios de unión inespecífica en las placas, utilizando 200 µL de PBS 1X con albúmina bovina al 1% (Productos Químicos Monterrey S.A, Nuevo León, México) y fueron incubadas una hora a 37°C. A continuación, se adicionó 100 µL de cada uno de los sueros de los ratones a una dilución 1:500 en PBST-Tween 20 al 0.05% por duplicado, y se incubaron durante una hora a 37 °C. Luego, se lavaron tres veces con PBS- Tween 20 al 0.05% para agregar después a cada uno de los pozos, 50 µL de anticuerpo IgG de cabra antiratón Sigma (San Luis, Missouri, EUA) acoplado a peroxidasa a una dilución de 1:7500 en PBS- Tween 20 al 0.05% y se incubó durante dos horas a 37°C. Después de tres lavados con PBS- Tween 20 al 0.05%. Se adicionó 100 µL de solución reveladora, transcurridos tres minutos se detuvo la reacción, agregando 50 µL de H₂SO₄ 2.5 N (Mayer, CDMX, México) y finalmente se realizó la lectura a 490 nm en un lector de ELISA Hlab (H Reader 1, Texas, EUA)²⁷. Las absorbancias obtenidas se interpolaron en la curva tipo, para determinar la concentración utilizando la formula $y = 0.1856x - 0.0054$.

Análisis estadístico

Para analizar las curvas de parasitemia, se calculó el área bajo la curva y se realizó un análisis de varianza (ANOVA) de dos vías, para correlacionar los datos. Para realizar el análisis histopatológico se realizó una prueba de Kruskal-Wallis, empleando un software especializado en estadística. Se consideraron como significativas las diferencias con valores de $P < 0.05$. Los análisis se realizaron empleando el software GraphPad Prism v.7 (GraphPad Software, La Jolla, California, EUA).

Resultados

El pH de los alimentos representa un parámetro para la viabilidad de los parásitos, por lo que se determinó en cada uno de los alimentos, se observa que los intervalos de pH están en el rango ácido a diferencia de la tortilla.

Tabla 2. pH de los alimentos analizados. Se realizó en condiciones de laboratorio a una temperatura de 25° C en la CDMX a una altura de 2240 msnm

Alimento	pH
Agua	6
Jugo de caña	5.6
Jugo de guayaba	4.8
Jugo de mandarina	3.1
Jugo de naranja	2.7
Açaí	4.3
Arroz	4.7
Pan	5.5
Tortilla	8.5
Inoculación directa v.o.	7

Fuente: Elaboración propia

La viabilidad de *T. cruzi* en los alimentos, limita el tiempo que permanece infectante por vía oral. En el que permanece más tiempo es en el jugo de guayaba seguido por el jugo açaí, el agua, el arroz y el jugo de caña de azúcar; con el jugo de mandarina y de naranja perdía su viabilidad inmediatamente figura 1.

Figura 1. Viabilidad. Tiempo en el que *T. cruzi* permanece viable en diversos alimentos y bebidas. Los datos se presentan como la media \pm D.E. de seis repeticiones por cada alimento; de izquierda a derecha en orden descendente con jugo de guayaba, jugo de açaí, agua, tortilla, pan, jugo de caña, jugo de mandarina y jugo de naranja. $P < 0.05$.

En los días postinoculación (p.i.) ninguno de los alimentos referidos en la bibliografía tabla 1 causantes de brotes causaron parasitemia al ser administrados vía v.o. Sin embargo, vía i.p. sí se detectó parasitemia figura 2.

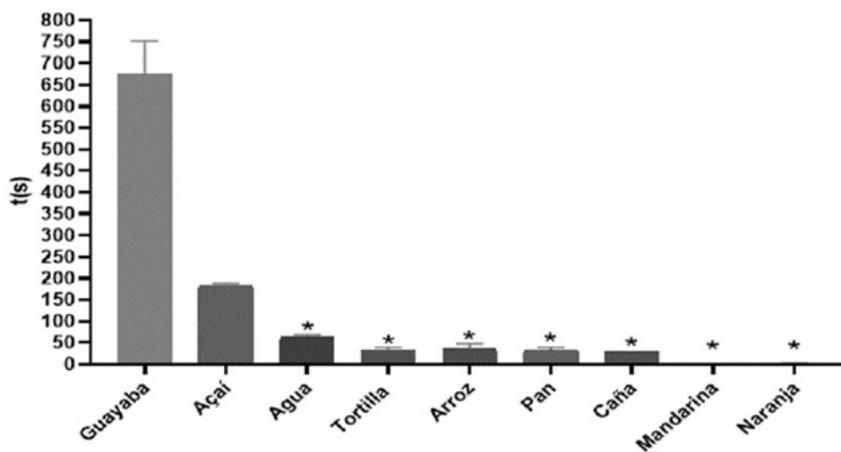
Figura 2. Curva de parasitemia de la infección por *T. cruzi* vía oral Vs vía i.p. No se registró parasitemia patente para el caso de la infección v.o.; en el caso de la infección vía i.p. la parasitemia se detectó desde el día 15 p.i., el pico máximo de parasitemia se determinó en el día 25 p.i. y se vuelve indetectable el día 28 p.i. Los datos se presentan como la media \pm D.E. de seis ratones por grupo: inoculados vía i.p. Vs. Inoculados vía v.o. El asterisco representa la diferencia entre el grupo inoculado vía i.p. y el inoculado vía v.o. $P < 0.05$.

En el estudio histopatológico del tejido cardiaco obtenido de los individuos infectado v.o., no se encontraron alteraciones tisulares, ni presencia de nidos de amastigotes; mientras que en el tejido cardiaco aquellos infectados vía i.p. se encontraron nidos de amastigotes, infiltrado inflamatorio, hemorragia y edema figura 3.

Figura 3. Histopatología de la infección por *T. cruzi* v.o. comparada con la vía i.p. A) Se muestra el tejido cardiaco de un ratón infectado vía oral, no se mostró ningún cambio en la arquitectura tisular ni presencia del parásito. B) Se muestra el tejido cardiaco de un ratón infectado vía intraperitoneal, se encontró la presencia de nidos de amastigotes (círculo), edema (asterisco) e infiltrado inflamatorio (flecha negra). El examen histopatológico clasificó la vía oral como ausente (-) por la ausencia de nidos y nulas evidencias del proceso inflamatorio, en comparación la vía i.p se clasificó como moderado (+) por el conteo de nidos de amastigotes e infiltrado inflamatorio.

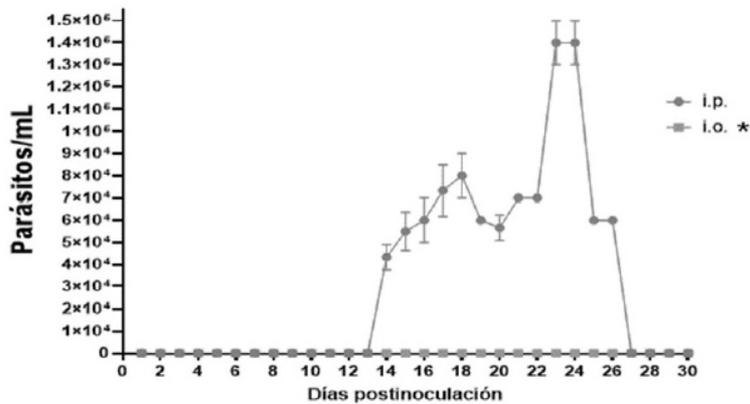
Figura 4. Curso de la hipergammaglobulinemia de la infección por *T. cruzi* vía oral. Determinación de la concentración de anticuerpos postinoculación en ratones infectados vía oral. La respuesta inmune humoral se observa mayor en la vía i.p. como control, los alimentos que muestran una mayor concentración de IgG son el agua y el fruto açaí. Los datos se presentan como la media \pm D.E. de seis ratones por grupo: inoculados vía oral con los alimentos reportados en los brotes; jugo de guayaba (línea discontinua punto en cuadrado), jugo de açaí (línea punteada flecha dirección derecha), agua (línea discontinua flecha dirección derecha), tortilla (línea discontinua punto rombo), pan (línea continua punto cuadrado), jugo de caña (línea continua flecha dirección izquierda), jugo de mandarina y jugo de naranja.

Figura 1.



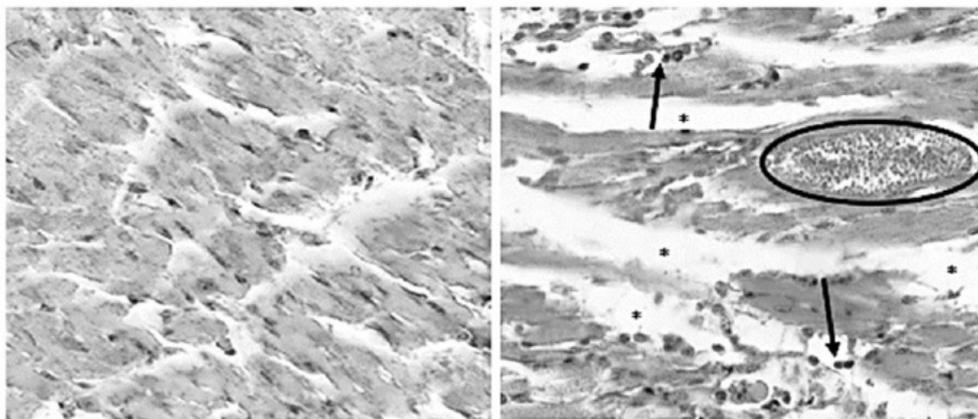
Fuente: Elaboración propia

Figura 2.



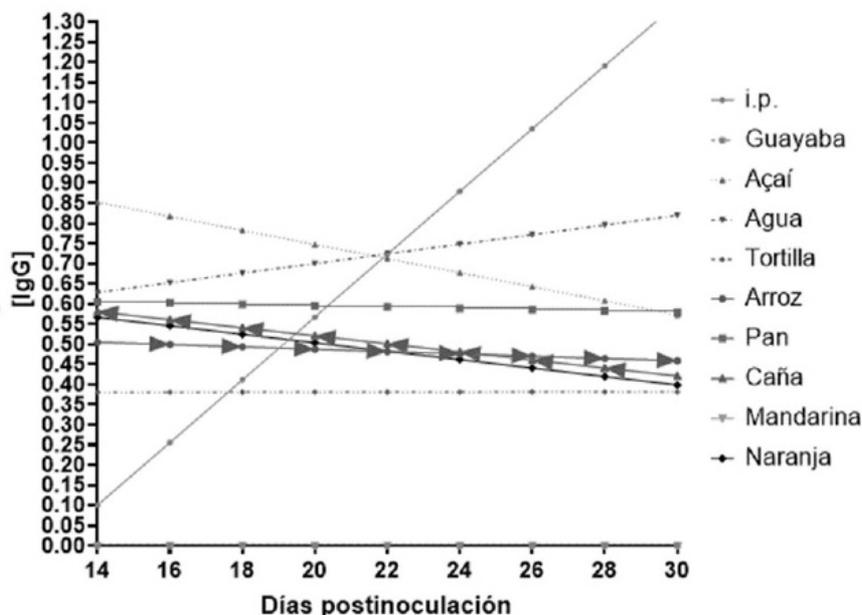
Fuente: Elaboración propia

Figura 3.



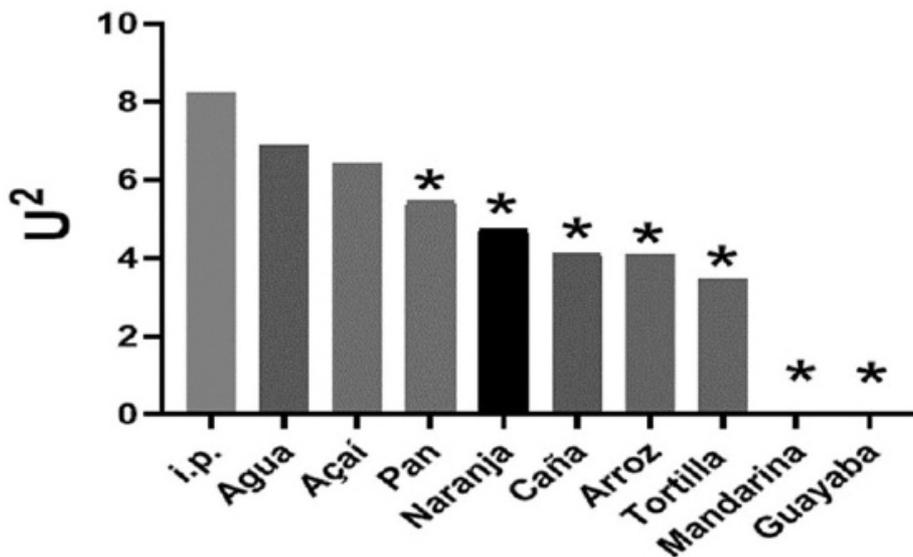
Fuente: Elaboración propia

Figura 4



Fuente: Elaboración propia

Figura 5.



Fuente: Elaboración propia

Figura 5. Área bajo la curva de la gráfica de anticuerpos postinoculación en ratones infectados vía intraperitoneal (i.p). Vs vía oral (v.o). Los datos se presentan como la media ± D.E. de la concentración de inmunoglobulinas de seis ratones por grupo: inoculados vía oral con los alimentos reportados como causales de brotes con base a las referencias tabla 1. El asterisco representa la diferencia entre los grupos de ratones alimentados v.o. con jugo de guayaba, jugo de açai, agua, tortilla, pan, jugo de caña, jugo de mandarina y jugo de naranja. El asterisco representa la diferencia entre las concentraciones de anticuerpos anti *T. cruzi*. $P < 0.05$. Estadísticamente no se observa una diferencia significativa entre la i.p., agua y açai.

Discusión

Los brotes de enfermedad de Chagas que han sido reportados en el continente americano, pueden ser causados debido al cambio climático que estamos atravesando y que ha hecho que los insectos transmisores de la infección con *T. cruzi* migren hacia las zonas habitadas por los humanos⁴, con lo que, transmisores y hospederos convivirían estrechamente. Este hecho puede conllevar que haya una mayor transmisión de la infección vía oral de la que se encuentra reportada y debido al curso natural y el cuadro clínico de la enfermedad, aunado a la poca relevancia que se le suele dar a esta importante parasitosis por el personal sanitario⁴, pondría a la enfermedad de Chagas como una enfermedad tropical desatendida, como lo reporta la OMS en América^{28,29}, y estaría infradiagnosticada en México.

El que transmisor y hospedero compartan espacios, aumenta exponencialmente la posibilidad de que ocurra la transmisión del parásito. Al respecto, se ha reportado que en los brotes de la enfermedad de Chagas lo más probable que ocurra es que el insecto transmisor deposite sobre los alimentos y bebidas de manera accidental¹⁴ y que después las personas los ingieran. Por ello es básico conocer el tiempo en el que el parásito permanece viable al estar sobre los alimentos. Se pudo demostrar que este tiempo varía ampliamente acorde al alimento del que se trate.

El jugo de guayaba fue en el alimento en él tuvo un mayor tiempo viable, sin embargo, fue mucho menor a lo reportado anteriormente (24 horas)³⁰ esto se puede deber a que el presente trabajo se realizó en la Ciudad de México, México que se encuentra a 2,240 msnm, mientras que el ensayo previo se realizó en Bucaramanga, Colombia, que se sitúa a 959 msnm. Actualmente no hay ningún reporte referente al efecto de la presión ambiental sobre la viabilidad de *T. cruzi*.

A este respecto se ha reportado que en otros microorganismos, la presión hidrostática aumenta la viscosidad del citoplasma y disminuyen la capacidad de las enzimas para unirse a sus sustratos³¹, hecho que pudiera estar ocurriendo en este caso.

Por otra parte, tanto en el jugo de mandarina como en el de naranja, el parásito perdió su viabilidad antes de los 30 s, esto podría deberse a una conjunción de la presión atmosférica y la densidad de estos alimentos; la densidad del jugo de naranja 1.05 g/cm³ y la del jugo de mandarina de 3.20 g/cm³, mientras que la densidad del jugo de guayaba 1.88 g/cm³, ésta última es casi idéntica a la densidad de las heces de los insectos triatomínicos transmisores de *T. cruzi* (1.86 g/cm³)³². Respecto al jugo de acaí su densidad es de 0.9 g/cm³ muy próxima a la del agua (1.0 g/cm³), de ahí que la viabilidad en ambos sea similar. Cabe mencionar que el pH tanto del jugo de guayaba (4.8) como el pH del jugo de

acaí (4.3) se encuentran en el rango reportado de las heces de los triatomínicos (de 3.8 a 5.5)³³.

Añadimos en este ensayo otros alimentos (además de los reportados en los brotes en Sudamérica) debido a que son alimentos ampliamente consumidos en México y forman parte de la canasta básica³⁴: tortilla (56.7 kg *per capita*)³⁵ y pan (33.5 kg *per capita*)³⁶, mismos que tuvieron un comportamiento similar al jugo de caña y al arroz, probablemente debido a su pH (arroz 6.5, tortilla 7.4, jugo de caña y pan 5.8).

Al obtener los corazones de los individuos infectados vía oral, en el estudio macroscópico no se observó ningún cambio de los que han sido reportados como propios de la infección por *T. cruzi*, tales como aneurisma ventricular, forma globular del órgano, mayor cantidad de líquido pericárdico, ni la presencia de nodulaciones con forma de “cuentas de rosario” en las arterias coronarias³⁷; a nivel histopatológico no se observaron los cambios tisulares que han sido reportados para la infección con *T. cruzi*. En el tejido cardíaco no hubo presencia ni de infiltrado inflamatorio, ni de los nidos de amastigotes del parásito, ni áreas de disociación de las fibras musculares³⁷. Esto puede deberse a la cepa del parásito empleada, debido a que la descripción de la infección se realizó en la zona norte de Brasil y aunque no menciona la cepa de la que se trata, acorde a lo reportado el DTU-IV es el que está presente³⁸ y en este caso, el estudio se realizó empleando la cepa NINOA perteneciente al TDU-1 que es el que predomina en México³⁹. Con lo que el presente trabajo apoya la consigna de que cada una de las cepas del parásito se comportan de manera muy diferente entre ellas y que por tanto, es un factor importante para tomar en cuenta clínicamente.

La respuesta inmune humoral juega un papel importante en la relación hospedero-parásito, esta respuesta le funciona al parásito como estrategia de supervivencia, ya que le permite permanecer mayor tiempo en el hospedero, aumentando la probabilidad de ser transmitido a otro hospedero⁴⁰. La respuesta montada contra el parásito es directamente proporcional a la concentración de anticuerpos circundantes⁴¹, así mismo la variabilidad antigénica del parásito montan una respuesta humoral específica, pero mixta, lo que provoca un título de anticuerpos sostenido⁴², respecto a la ingesta del parásito las enzimas salivales y los alimentos lo llevan a un estrés osmótico⁴³ generando antígenos que inician una respuesta humoral rápida y sostenida, lo que sugiere que el parásito no llegó íntegro a las mucosas donde puede ser absorbido, sino que, llegó parcialmente procesado, lo que sugeriría una respuesta humoral anticipada. Esta evidencia adquiere un peso mayor, al ser comparada con la inoculación intraperitoneal, que muestra un título de anticuerpos menor, ya que la vía clásica de la infección por esta enfermedad

involucra un procesamiento del parásito, por células inmunes capaces de presentar sus antígenos para la posterior producción de anticuerpos⁴⁴. Por otra parte, la respuesta humoral que se presentó por los diferentes alimentos mostro una diferencia significativamente menor comparada con la vía i.p.; se ha establecido la capacidad experimental de *T. cruzi* para infectar v.o. con inóculos mayores 10,000 veces⁴⁵ cantidades en las que se asegura el éxito infectivo de los tripomastigotes, debido a que al ser superior el número de parásitos no todos sucumbirían a la lisis por estrés osmótico⁴³.

Este estudio también da un acercamiento a la carga parasitaria y vía de inoculación, ya que estas dos variables son determinantes en la respuesta inmune hacia la infección, siendo la vía de entrada, en este caso oral, hará que las mucosas monten un sistema de defensa diferente, que lleve a la enfermedad a una evolución no "clásica"⁴⁶. Los presentes resultados sugieren que el açai y el agua, estadísticamente presentan una inmunoglobulinemia igual que la infección vía i.p., debido a que estos dos alimentos les proporcionan un nicho infectivo similar al tener características fisicoquímicas cercanas al de las deyecciones de los insectos transmisores.

Así, los resultados obtenidos en este estudio sugieren que, aunque el parásito no tuvo un comportamiento clásico parasitoscópica e histológicamente, sí hubo una respuesta humoral; con lo cual no se puede descartar ni que el hospedero no haya experimentado una infección activa (consecuentemente) y ni la probabilidad de que fuese posible la transmisión del parásito por el hospedero inoculado vía oral, mediante un trasplante o transfusión. Todo ello, poniendo en evidencia la importancia clínica que tiene el realizar escrutinios, que empleen más de un tipo de prueba diagnóstica en la etapa aguda de la enfermedad, en la búsqueda de este tipo de infecciones parasitarias desatendidas como lo sugiere la OMS, así como la necesidad de continuar la realización de estudios respecto a este tipo de parásitos transmisibles mediante múltiples vías.

Conclusión

Así pues, en el caso de la adquisición de la enfermedad por la vía oral es menos virulenta para el hospedero, que aquella adquirida vía intraperitoneal porque aunque *Trypanosoma cruzi* no tiene la capacidad de provocar parasitemia aparente, sí hay producción de anticuerpos contra este parásito.

En este trabajo se demuestra que la vía de transmisión de la enfermedad de Chagas, es un factor importante por tomar en cuenta para el personal médico que atiende estos pacientes, debido a que ésta afecta el curso de la infección y por otro lado, resalta la importancia de realizar al menos dos tipos de pruebas para comprobar el diagnóstico y de realizar una

detallada historia clínica, sobre todo de aquellos pacientes que provienen o han estado en países en los que se encuentran los insectos vectores de *T. cruzi*.

Agradecimientos

Al Doctor en Ciencias Benjamín Noguera por amablemente donar y cultivar la cepa NINOA de *Trypanosoma cruzi*.

Referencias

1. Shikanai-Yasuda MA, Carvalho NB. Oral transmission of Chagas disease. Clin Infect Dis. 2012;54(6):845-52.
2. Shikanai-Yasuda MA, Marcondes CB, Guedes LA, Siqueira GS, Barone AA, Dias JC, et al. Possible oral transmission of acute Chagas' disease in Brazil. Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 1991;33(5):351-7.
3. Barreto-de-Albuquerque J, Silva-dos-Santos D, Perez AR, Berbert LR, de Santana-van-Vliet E, Farias-de-Oliveira DA, et al. Trypanosoma cruzi Infection through the Oral Route Promotes a Severe Infection in Mice: New Disease Form from an Old Infection? PLoS Negl Trop Dis. 2015;9(6):e0003849.
4. Benchimol-Barbosa PR. Trends on acute Chagas' disease transmitted by oral route in Brazil: steady increase in new cases and a concealed residual fluctuation. Int J Cardiol. 2010;145(3):494-6.
5. Coura JR. [Transmission of chagasic infection by oral route in the natural history of Chagas disease]. Rev Soc Bras Med Trop. 2006;39 Suppl 3:113-7.
6. Covarrubias C, Cortez M, Ferreira D, Yoshida N. Interaction with host factors exacerbates Trypanosoma cruzi cell invasion capacity upon oral infection. Int J Parasitol. 2007;37(14):1609-16.
7. Benchimol-Barbosa PR. Predictors of mortality in Chagas' disease: the impact of atrial fibrillation and oral transmission on infected population. Int J Cardiol. 2009;133(2):275-7.
8. Calvo-Mendez ML, Noguera-Torres B, Alexandre-Aguilar R, Cortes-Jimenez M. [Experimental Trypanosoma cruzi infection via contaminated water and food]. Rev Latinoam Microbiol. 1994;36(1):67-9.
9. Nobrega AA, Garcia MH, Tatto E, Obara MT, Costa E, Sobel J, et al. Oral transmission of Chagas disease by consumption of acai palm fruit, Brazil. Emerg Infect Dis. 2009;15(4):653-5.

10. Pinto AY, Harada GS, Valente V, Abud JE, Gomes F, Souza GC, et al. [Cardiac attacks in patients with acute Chagas disease in a family micro-outbreak, in Abaetetuba, Brazilian Amazon]. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2001;34(5):413-9.
11. Zuleta-Duenas LP, Lopez-Quiroga AJ, Torres-Torres F, Castaneda-Porras O. [Possible oral transmission of Chagas disease among hydrocarbons sector workers in Casanare, Colombia, 2014]. *Biomedica.* 2017;37(2):218-32.
12. Santana RAG, Guerra M, Sousa DR, Couceiro K, Ortiz JV, Oliveira M, et al. Oral Transmission of *Trypanosoma cruzi*, Brazilian Amazon. *Emerg Infect Dis.* 2019;25(1):132-5.
13. Dias JP, Bastos C, Araujo E, Mascarenhas AV, Martins Netto E, Grassi F, et al. Acute Chagas disease outbreak associated with oral transmission. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2008;41(3):296-300.
14. Bastos CJ, Aras R, Mota G, Reis F, Dias JP, de Jesus RS, et al. Clinical outcomes of thirteen patients with acute chagas disease acquired through oral transmission from two urban outbreaks in northeastern Brazil. *PLoS Negl Trop Dis.* 2010;4(6):e711.
15. Andrade SG, Campos RF, Steindel M, Guerreiro ML, Magalhaes JB, Almeida MC, et al. Biological, biochemical and molecular features of *Trypanosoma cruzi* strains isolated from patients infected through oral transmission during a 2005 outbreak in the state of Santa Catarina, Brazil: its correspondence with the new *T. cruzi* Taxonomy Consensus (2009). *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2011;106(8):948-56.
16. Vargas A, Malta J, Costa VMD, Claudio LDG, Alves RV, Cordeiro GDS, et al. [Investigation of an outbreak of acute Chagas disease outside the Amazon Region, in Rio Grande do Norte State, Brazil, 2016]. *Cad Saude Publica.* 2018;34(1):e00006517.
17. Dias GB, Gruending AP, Araujo SM, Gomes ML, Toledo MJ. Evolution of infection in mice inoculated by the oral route with different developmental forms of *Trypanosoma cruzi* I and II. *Exp Parasitol.* 2013;135(3):511-7.
18. Hernandez Libia, Cano Alba, Cucunubá Zulma M, Zambrano Pilar. Brote de Chagas Agudo en Lebrija, Santander 2008. *Revista del Observatorio Salud Pública de Santander.* (2009). 4. 28-36.
19. de Diego JA, Palau MT, Gamallo C, Penin P. Relationships between histopathological findings and phylogenetic divergence in *Trypanosoma cruzi*. *Trop Med Int Health.* 1998;3(3):222-33.
20. University Jh. Animalcare procedures mouse 2020 [cited 2020. Available from: <http://web.Jhu.Edu/animalcare/procedures/mouse.Html#top>.
21. Buekens P, Cafferata ML, Alger J, Althabe F, Belizan JM, Carlier Y, et al. Congenital transmission of *Trypanosoma cruzi* in Argentina, Honduras, and Mexico: study protocol. *Reprod Health.* 2013;10:55.
22. Silva-Dos-Santos D, Barreto-de-Albuquerque J, Guerra B, Moreira OC, Berbert LR, Ramos MT, et al. Unraveling Chagas disease transmission through the oral route: Gateways to *Trypanosoma cruzi* infection and target tissues. *PLoS Negl Trop Dis.* 2017;11(4):e0005507.
23. Salazar-Schettino PM, Jimenez J, Tay J, Cardenas Ramirez L. [Comparative study of the pathogenicity of 4 strains of *T. cruzi* in white mice]. *Rev Latinoam Microbiol.* 1978;20(1):51-7.
24. Díaz-Limay Enrique, Escalante Hermes, Jara César A.. Niveles de parasitemia y alteraciones histopatológicas en *Mus musculus* BALB/c infectado con *Trypanosoma cruzi* obtenido de *Panstrongylus chinai* del Valle Chamán, La Libertad - Perú. *Parasitol. latinoam.* [Internet]. 2004 Jul [citado 2020 Ago 29]; 59(3-4): 153-158. Disponible en: https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0717-77122004000300011&lng=es. <http://dx.doi.org/10.4067/S0717-77122004000300011>.
25. Brener Z. Therapeutic activity and criterion of cure on mice experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 1962;4:389-96.
26. Rimoldi A, Tome Alves R, Ambrosio DL, Fernandes MZ, Martinez I, De Araujo RF, et al. Morphological, biological and molecular characterization of three strains of *Trypanosoma cruzi* Chagas, 1909 (Kinetoplastida, Trypanosomatidae) isolated from *Triatoma sordida* (Stal) 1859 (Hemiptera, Reduviidae) and a domestic cat. *Parasitology.* 2012;139(1):37-44.
27. Reiche EM, Cavazzana M, Jr., Okamura H, Tagata EC, Jankevicius SI, Jankevicius JV. Evaluation of the western blot in the confirmatory serologic diagnosis of Chagas' disease. *Am J Trop Med Hyg.* 1998;59(5):750-6.
28. OMS. Enfermedad de Chagas 2020 [Available from: https://www.who.int/topics/chagas_disease/es/#:~:text=La%20enfermedad%20de%20Chagas%2C%20tambi%C3%A9n,el%20par%C3%A1sito%20protozoo%20Trypanosoma%20cruzi].

29. OPS. Enfermedad de Chagas 2020 [Available from: <https://www.paho.org/es/temas/enfermedad-chagas>].
30. Suárez Diana Carolina, Rey Ángela Patricia, Orduz Magda Lorena, Prada Renzo Leonardo, Tarazona Zorayda. Supervivencia de *Trypanosoma cruzi* en bebidas experimentalmente contaminadas. *Biomédica* [Internet]. 2012 Mar [cited 2020 Aug 29]; 32(1): 134-138. Available from: http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-41572012000100015&lng=en.
31. Granada Ud. EFECTOS DE LA PRESIÓN OSMÓTICA 2020 [Available from: https://www.ugr.es/~eianez/Microbiologia/13agfisicos.htm#_Toc59451641].
32. Molina-Garza ZJ, Rosales-Encina JL, Galaviz-Silva L, Molina-Garza D. Prevalencia de *Trypanosoma cruzi* en triatomos silvestres de Nuevo León, México %J *Salud Pública de México*. 2007;49:37-44.
33. Waniek PJ, Pacheco Costa JE, Jansen AM, Costa J, Araujo CA. Cathepsin L of *Triatoma brasiliensis* (Reduviidae, Triatominae): sequence characterization, expression pattern and zymography. *J Insect Physiol*. 2012;58(1):178-87.
34. SAGARPA. Canasta basica Mexico2020 [Available from: <https://www.gob.mx/canastabasica>].
35. sedrssa. Consumo, distribución y producción de alimentos: el caso del complejo maíz-tortilla 2014 [Available from: http://www.cedrssa.gob.mx/files/b/13/40Reporte_ma%C3%ADz-tortilla_septiembre_2014.pdf].
36. CANAINPA. El mundo del pan 2020 [Available from: http://www.canainpa.com.mx/Imagenes/rev_pan/revista.pdf].
37. Souza Ddo S, Araujo MT, dos Santos P, Furtado JC, Figueiredo MT, Povoá RM. Anatomopathological Aspects of Acute Chagas Myocarditis by Oral Transmission. *Arq Bras Cardiol*. 2016;107(1):77-80.
38. Esper HR, Freitas VLT, Assy J, Shimoda EY, Berreta OCP, Lopes MH, et al. Fatal evolution of acute Chagas disease in a child from Northern Brazil: factors that determine poor prognosis. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2019;61:e27.
39. Bosseno MF, Barnabe C, Magallon Gastelum E, Lozano Kasten F, Ramsey J, Espinoza B, et al. Predominance of *Trypanosoma cruzi* lineage I in Mexico. *J Clin Microbiol*. 2002;40(2):627-32.
40. Vega S, Sibona GJ. Modelado Matemático de la Triponosomiasis Chagásica. *CeD* [Internet]. 27jul.2019 [citado 28ago.2020];10(2). Available from: https://revistas.uptc.edu.co/index.php/ciencia_en_desarrollo/article/view/9524
41. Reyes MB, Lorca M, Munoz P, Frasch AC. Fetal IgG specificities against *Trypanosoma cruzi* antigens in infected newborns. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1990;87(7):2846-50.
42. Higuchi Mde L, De Brito T, Martins Reis M, Barbosa A, Bellotti G, Pereira-Barreto AC, et al. Correlation between *Trypanosoma cruzi* parasitism and myocardial inflammatory infiltrate in human chronic chagasic myocarditis: Light microscopy and immunohistochemical findings. *Cardiovascular pathology : the official journal of the Society for Cardiovascular Pathology*. 1993;2(2):101-6.
43. Noya BA, Colmenares C, Ruiz-Guevara R, Díaz-Bello Z, Noya O. La transmisión oral de la Enfermedad de Chagas. *Rev Fac Med*. 2010;33:78-86.
44. CA. LFZ. Inmunología de la infección por *T. Cruzi* y de la enfermedad de Chagas. *Enf Emerg*. 2006;8:17-9.
45. Hoft DF, Farrar PL, Kratz-Owens K, Shaffer D. Gastric invasion by *Trypanosoma cruzi* and induction of protective mucosal immune responses. *Infect Immun*. 1996;64(9):3800-10.
46. de Meis, Juliana et al. “*Trypanosoma cruzi* Entrance through Systemic or Mucosal Infection Sites Differentially Modulates Regional Immune Response Following Acute Infection in Mice.” *Frontiers in immunology* vol. 4 216. 26 Jul. 2013, doi:10.3389/fimmu.2013.00216