



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

RESPUESTA INMUNE CELULAR CONTRA CEPAS
MEXICANAS DE *Trypanosoma cruzi*: PAPEL DE LAS
CITOCINAS.

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
B I O L O G A
P R E S E N T A :
DOLORES MARIA TERESA RICO RAMIREZ



DIRECTORA DE ESTUDIOS DE GRADUADOS:
DRA. BERTHA ESPINOZA GUERREROS



MEXICO, D. F.,

FACULTAD DE CIENCIAS
SECCION ESCOLAR

2004



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

ACT. MAURICIO AGUILAR GONZÁLEZ
Jefe de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo escrito:
"Respuesta inmune celular contra cepas mexicanas de
Trypanosoma cruzi: Papel de las citocinas"

realizado por Rico Ramírez Dolores María Teresa

con número de cuenta 8922000-3 , quien cubrió los créditos de la carrera de:

Biología

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis

Propietario

Dra. Bertha Espinoza Gutiérrez

Propietario

Dra. Rosaura Mayén Estrada

Propietario

Dra. Laila Gutiérrez Kobeh

Suplente

Dra. Ma. Antonieta Aladro Lubel

Suplente

Dr. Guillermo Balgado Maldonado

Consejo Departamental de BIOLOGIA

FACULTAD DE CIENCIAS

W. G. Juan Manuel Rodríguez Orta



Universidad Nacional Autónoma de México.

FACULTAD DE CIENCIAS.

**RESPUESTA INMUNE CELULAR CONTRA CEPAS MEXICANAS DE
Trypanosoma cruzi: PAPEL DE LAS CITOCINAS.**

**TESIS QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
BIÓLOGA.**

PRESENTA:

DOLORES MARÍA TERESA RICO RAMÍREZ.

Este trabajo fue dirigido por la Dra. Bertha Espinoza Gutiérrez en el Departamento de Inmunología del Instituto de investigaciones Biomédicas y contó con el apoyo de los proyectos de la DPAPA de la U.N.A.M. con número PAPIIT IN232399 y de CONACYT con número 27951M. Agradezco la beca otorgada por el proyecto de la DGAPA para la realización de este trabajo.

MÉXICO, D.F.

2004.

AGRADECIMIENTOS ACADEMICOS

A la Dra. Bertha Espinoza Gutiérrez por permitirme realizar este trabajo bajo su asesoría.

Al técnico Académico Biol. Esther Pacheco Hurtado, por su asesoría y paciencia para enseñarme el funcionamiento del equipo con el que cuenta el laboratorio y algunas técnicas que me ayudaron a la realización de este trabajo.

Al Biólogo Sandro Sosa Aguilar por su colaboración durante la parte experimental de este trabajo.

Al comité de sinodales integrado por las Dras. Bertha Espinoza Gutiérrez, Rosaura Mayén Estrada, Laila Gutiérrez Kobeh, Ma. Antonieta Aladro Lubel y el Dr. Guillermo Salgado Maldonado por sus atinadas observaciones durante la revisión de esta tesis.

DEDICATORIA.

A la memoria de mis padres José Merced Rico González y Martina Ramírez Casique por su tiempo y apoyo.

A mis hermanos Araceli, Claudia, Rosa, Lilia, René, Jorge, Samuel, José, Roberto y a mis sobrinos por darme ánimos para concluir este trabajo.

A la familia Sosa por su amistad.

A la Universidad Nacional Autónoma de México por la educación y las enseñanzas que me brindo.

A mis compañeros de laboratorio, Dra. Rosalía, Fabián, Ma. Luisa, Oralia, Bety, Guiehdani, Fernando, Edgar, Andrea, Ivone e Ignacio.

Dormía y soñé que la vida es placer
Desperté y vi que la vida es deber.
Trabajé y observé que el deber es placer.
Nietzsche

	Págs.
INDICE	
RESÚMEN	1
I. INTRODUCCION.	3
I.1 GENERALIDADES.	3
I.2. EL PARÁSITO.	3
I.2.a. Clasificación taxonómica.	3
I.2.b. Morfología del parásito.	4
I.2.c. Ciclo de vida.	5
I.2.d. Caracterización de las cepas de <i>Trypanosoma cruzi</i>	6
I.3. LA ENFERMEDAD DE CHAGAS.	8
I.3.a. Fase aguda.	8
I.3.b. Fase crónica indeterminada.	9
I.3.c. Fase crónica sintomática.	9
I.4. EPIDEMIOLOGÍA.	10
I.5. INTERACCIÓN PARÁSITO CÉLULA HOSPEDERA.	10
I.6. MECANISMOS DE RESPUESTA INMUNE.	11
I.6.a. Anticuerpos.	11
I.6.b. Células.	13
I.6.c. Citocinas.	14
II. JUSTIFICACION.	20
III. OBJETIVOS.	21
IV. MATERIAL Y MÉTODO.	22
IV.a. Animales.	22
IV.b. Cepas e infección.	22
IV.c. Supervivencia.	22
IV.d. Parasitemia.	23
IV.e. Determinación de anticuerpos.	23
IV.f. Proliferación de células de bazo.	24
IV.g. Cuantificación de citocinas en suero de ratones infectados y sobrenadante de células de bazo.	25
IV.h. Estadística.	26
V. RESULTADOS.	27
V.1. DETERMINACIÓN DE LA VIRULENCIA.	27
V.2. PARASITEMIA.	28
V.3. DETERMINACIÓN DE ANTICUERPOS.	30
V.4. SECRECIÓN DE CITOCINAS EN SUERO DE RATONES INFECTADOS.	33

V.5. SECRECIÓN DE CITOCINAS EN SOBRENADANTE DE CÉLULAS DE BAZO.	44
VI. DISCUSIÓN.	48
VI.1. VIRULENCIA.	48
VI.2. PARASITEMIA.	49
VI.3. ANTICUERPOS.	51
VI.4. CITOCINAS EN SUERO DE RATONES INFECTADOS.	51
VI.5. SECRECIÓN DE CITOCINAS EN SOBRENADANTE DE CÉLULAS DE BAZO.	53
VII. CONCLUSIONES.	55
VIII. BIBLIOGRAFIA.	56
APÉNDICE 1 REACTIVOS UTILIZADOS EN TÉCNICA DE PROLIFERACIÓN DE CÉLULAS DE BAZO.	65
APÉNDICE 2 TÉCNICA DE PROLIFERACIÓN CELULAR.	66
APÉNDICE 3 SOBREVIVENCIA EN RATONES INFECT. CON 100 MIL PARÁSITOS DE CEPA B DE <i>T. cruzi</i>	67
APÉNDICE 4 SOBREVIVENCIA DE RATONES INFECT. CON 10 MIL PARÁSITOS DE CEPA B DE <i>T. cruzi</i>	68
APÉNDICE 5 PARASITEMIA EN SANGRE DE RATONES INFECT. CON 100 MIL PARÁSITOS DE CEPA VIRULENTE DE <i>T. cruzi</i>	69
APÉNDICE 6 PARASITEMIA EN SANGRE DE RATONES INFECT CON 10 MIL PARÁSITOS DE CEPA VIRULENTE DE <i>T. cruzi</i>	70
APÉNDICE 7 PARASITEMIA EN SANGRE DE RATONES INFECT CON 100 MIL PARÁSITOS DE CEPA AVIRULENTE DE <i>T. cruzi</i>	71
APÉNDICE 8 PARASITEMIA EN SANGRE DE RATONES INFECT CON 10 MIL PARÁSITOS DE CEPA AVIRULENTE DE <i>T. cruzi</i>	72
APÉNDICE 9 ANTICUERPOS PRESENTES EN SUERO DE RATONES INFECT CON 100 MIL PARÁSITOS DE CEPA VIRULENTE de <i>T. cruzi</i>	73
APÉNDICE 10 ANTICUERPOS PRESENTES EN SUERO DE RATONES INFECT CON 10 MIL PARÁSITOS DE CEPA VIRULENTE DE <i>T. cruzi</i>	74
APÉNDICE 11 ANTICUERPOS PRESENTES EN SUERO DE RATONES INFECT CON 100 MIL PARÁSITOS DE CEPA AVIRULENTE DE <i>T. cruzi</i>	75
APÉNDICE 12 ANTICUERPOS PRESENTES EN SUERO DE RATONES INFECT CON 10 MIL PARÁSITOS DE CEPA AVIRULENTE de <i>T. cruzi</i>	76
APÉNDICE 13 TABLAS DE DENSIDAD ÓPTICA Y CONCENTRACIÓN DE CITOCINAS TH1 (IL-12 P40 E IFN-GAMMA) EN SUERO DE RATONES INFECT CON 100 Y 10 MIL PARÁSITOS DE CEPAS VIRULENTE Y AVIRULENTE DE <i>T. cruzi</i>	77
APÉNDICE 14 TABLAS DE DENSIDAD ÓPTICA Y CONCENTRACIÓN DE CITOCINAS TH1 (IL-10 E IL-4) EN SUERO DE RATONES INFECT CON 100 Y 10 MIL PARÁSITOS DE CEPAS VIRULENTE Y AVIRULENTE DE <i>T. cruzi</i>	83
APÉNDICE 15 CITOCINAS TH1 (IFN-GAMMA E IL-12 P40) EN SOBRENADANTES DE CÉLULAS DE BAZO DE LOS RATONES INFECTADOS CON 100 MIL PARÁSITOS DE CEPAS VIRULENTE Y AVIRULENTE DE <i>T. cruzi</i>	89
APÉNDICE 16. CITOCINAS TH2 (IL-10 E IL-4) EN SOBRENADANTES DE CÉLULAS DE BAZO DE LOS RATONES INFECTADOS CON 100 MIL PARÁSITOS DE CEPAS VIRULENTE Y AVIRULENTE DE <i>T. cruzi</i>	91

RESUMEN

El parásito intracelular *Trypanosoma cruzi* es un protozooario hemoflagelado, causante de la enfermedad de Chagas, ésta constituye un problema de salud pública en América Latina. En el laboratorio se han caracterizado cepas mexicanas de *T. cruzi* demostrándose que pertenecen al genotipo 1. En este trabajo se observó que una cepa mexicana causó en ratón Balb/c una mortalidad de 100% en el día 54 p.i. (inóculo con 100 mil parásitos) y en el día 57 p.i. (inóculo con 10 mil parásitos). En cambio este comportamiento no se observó con otra cepa que resultó avirulenta pues ningún ratón murió cuando se utilizaron los mismos inóculos ya que se observó un 100% de sobrevivencia hasta el día 98 p.i. y no habiendo diferencias significativas entre los dos inóculos. En cuanto a la carga parasitaria los ratones infectados con el inóculo de 100 mil y 10 mil parásitos de la cepa virulenta presentaron un pico máximo de 4.07×10^6 y 2.9×10^6 de parásitos por mililitro respectivamente estos fueron niveles mas altos significativamente respecto a las parasitemias encontradas en los ratones infectados con la cepa avirulenta en ambos inóculos. Respecto al día de aparición de la parasitemia en los ratones infectados con 100 mil y 10 mil parásitos de ambas cepas no hubo diferencias significativas. Por otro lado, la presencia de anticuerpos detectado por el método de ELISA se empieza a incrementar durante la primera semana y no hubo diferencias significativas entre ambas cepas ni entre inóculos. La presencia de anticuerpos alcanzó su máximo nivel en los días 20 a 30 p.i., estos días estuvieron correlacionados con los días en que la parasitemia llegó a su pico máximo y comenzó el descenso esto sucedió en ambas cepas con ambos inóculos. En los ratones infectados con la cepa virulenta cuando se inició la disminución en la cantidad de parásitos en circulación, comenzó la muerte de los ratones, en cambio en los ratones infectados con la cepa avirulenta se observó esta misma disminución del número de parásitos pero nunca hubo mortalidad de los ratones, aunque el experimento se siguió hasta el día 98 p.i. En cuanto al patrón de citocinas observado en suero de ratones infectados con los dos inóculos (10 mil y 100 mil), la citocina IL-12 p40 en suero de ratones infectados con 100 mil parásitos de la cepa virulenta tuvo un incremento significativo en el día 14 p.i. respecto al grupo control y al suero de ratones infectados con la cepa avirulenta con el mismo inóculo. Este comportamiento se repitió cuando se utilizó el inóculo de 10 mil parásitos y no hubo diferencias significativas

entre ambos inóculos. En la citocina $INF-\gamma$ presentó durante la fase aguda niveles altos y significativos respecto al grupo control y al suero de los ratones infectados con la cepa avirulenta.

En el sobrenadante de células de bazo de ratones infectados con 100 mil parásitos en la citocina IL-12 no se presentó diferencias significativas en los ratones infectados con ambas cepas. En cuanto a la citocina $IFN-\gamma$ se observó el mismo comportamiento que en suero de los ratones infectados, estos incrementos fueron significativos en los ratones infectados con ambas cepas durante la fase aguda de la infección. Por otro lado, en la citocina IL-10 en el sobrenadante de células de bazo de ratones infectados con ambas cepas no se observaron diferencias significativas. En el caso de la citocina IL-4 en sobrenadante de células de bazo de ratones infectados con la cepa avirulenta presentó niveles más altos y significativos respecto a la fase crónica y respecto al sobrenadante de los ratones infectados con la cepa avirulenta y al grupo control. En cambio, en el sobrenadante de células de bazo de los ratones infectados con la cepa virulenta no hubo diferencias significativas. Podemos concluir que en este trabajo el patrón de citocinas observado fue tipo Th1 y Th2 con la presencia importante de $INF\gamma$ que presentó diferencias significativas tanto en suero como en sobrenadante de las células de bazo de los ratones infectados con la cepa virulenta. En este trabajo se sugiere que presencia de la citocina IL-4 durante la fase aguda en el sobrenadante de células de bazo de ratones infectados con la cepa avirulenta tuvo una participación importante ya que, ante la presencia de niveles moderados de $INF\gamma$ observados en suero y sobrenadante, la presencia de esta citocina es benéfica en estos ratones controlando la infección. La citocina IL-10 no tuvo diferencias significativas en sobrenadante de las células de bazo respecto al grupo control e infectado, pero en suero hubo decrementos significativos respecto al control, que se cree que faltó regulación de la respuesta inmune Th1 exagerada.

I. INTRODUCCION.

I.1. GENERALIDADES.

Trypanosoma cruzi es un parásito hemoflagelado causante de la enfermedad de Chagas, la cual es transmitida por un insecto hematófago del género *Triatoma*, esta enfermedad constituye un problema importante de salud pública en el Continente Americano ya que se sabe que afecta alrededor de 20 millones de personas (Andersson y cols., 2003), y se ha calculado que 100 millones de personas que viven en América Latina están en riesgo de contraer la enfermedad (De Souza, 2002). Todas las especies de triatomíneos son consideradas vectores potenciales de la Enfermedad de Chagas pero los más importantes son aquellos que se han adaptados al domicilio humano. Cabe mencionar que el segundo medio de infección es por transfusión sanguínea. El corazón es el principal órgano involucrado en la patogenia, desarrollándose cardiopatías que son la causa de muerte en los individuos infectados (Engman y León, 2002). El Censo Nacional del 2000 en México detectó seroprevalencia a esta infección e indicó que 1.6 millones de personas podrían estar infectados con *T. cruzi*, de estos una tercera parte está localizada en zonas rurales y dos terceras partes en zonas urbanas. También se ha calculado que 155 000 niños menores de 5 años podrían estar infectados con este parásito (Guzmán-Bracho, 2001).

I.2. EL PARÁSITO.

I.2.a. Clasificación taxonómica (Leedale y Vickerman, 2000).

Phylum	Euglenozoa Cavalier-Smith, 1981
Clase	Diplonemea Cavalier-Smith, 1993
Orden	Kinetoplastea Honingberg, 1963
Suborden	Trypanosomatina Kent, 1880
Familia	Trypanosomatidae Doflein, 1901
Género	<i>Trypanosoma</i> Gruby, 1843
Subgénero	<i>Schizotrypanum</i> Chagas, 1909
Especie	<i>Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi</i> (Chagas, 1909)

I.2.b. Morfología del parásito.

Durante el ciclo de vida de *T. cruzi* se presentan 4 estadios morfológicos:

Amastigote. Es de forma redondeada, carece de flagelo, tiene un gran núcleo cerca del cual se encuentra el cinetoplasto a manera de disco, la forma de división es por fisión binaria. Se localiza en los tejidos (miocardio, esófago, colon, neuroglía y células del sistema retículo endotelial) del huésped vertebrado (Fig. 1).

Epimastigote. Es fusiforme, mide entre 20 a 40 μ m de largo y presenta un cinetoplasto localizado en la parte anterior del núcleo, con un flagelo que forma una membrana ondulante que nace del blefaroplasto, este estadio presenta la capacidad de multiplicación por fisión binaria longitudinal en el aparato digestivo del vector y se puede mantener en medios de cultivo específicos (Fig. 1).

El tripomastigote sanguíneo. Mide alrededor de 25 μ m de longitud y 2 μ m de anchura, es fusiforme y generalmente está incurvado en forma de C, U o S, su cinetoplásto está colocado en el polo posterior del núcleo y es muy grande, al mismo nivel del cinetoplasto se encuentra el blefaroplasto, de este nace el flagelo que se adhiere a la membrana ondulante. Puede ser observado en: células del tejido y en sangre del vertebrado hospedero, en las heces del vector donde se conoce como tripomastigote metacíclico, también se puede observar en la fase estacionaria en cultivos de crecimiento axénico y en fase líquida de cultivos celulares, estas formas no son capaces de dividirse pero si de invadir diferentes tipos celulares (Fig. 1) (De Souza, 2002). Se han observado diferencias morfológicas en los tipos sanguíneos, unos son delgados con un núcleo elongado, con el cinetoplasto subterminal y un flagelo corto y libre, otros son anchos con núcleo oval y el cinetoplasto casi terminal. La predominancia de una u otra forma es dependiente de la cepa de *T. cruzi* y el tiempo de infección. Sobre esto se ha sugerido que la forma delgada es principalmente responsable de la infección en células de vertebrados mientras que, formas anchas son más capaces de infectar a hospederos

invertebrados (De Souza, 2002). Brener sugiere que los cambios morfológicos son resultado del polimorfismo del género *Trypanosoma*, y difieren en su capacidad de penetrar a las células del huésped (referido en Velásco y cols., 1991).

Esferomastigote es una forma de transición común entre las fases de amastigote y tripomastigote, comúnmente se encuentra en el intestino del vector.

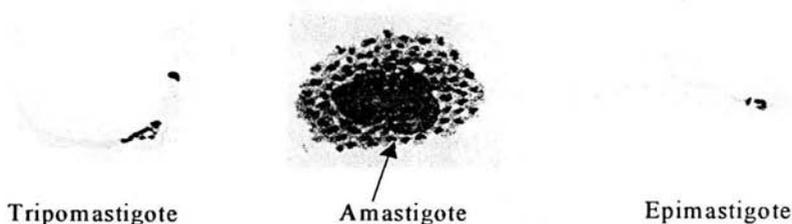


Figura 1. Diferentes formas de *T. cruzi* (tomado de De Souza, 2002)
<http://www.kinetoplastids.com/content/1/1/3>

I.2.c. Ciclo de vida.

El parásito experimenta diversos cambios morfológicos y bioquímicos durante su ciclo de vida, el cuál se lleva a cabo en diferentes hospederos vertebrados los cuales son mamíferos y también en numerosas especies de vectores hemípteros de la familia de Reduviidae, tales como *Triatoma*, *Rhodnius* y *Panstrongylus* entre otros, los cuales, mantienen al parásito dentro del tracto digestivo. Cuando el insecto succiona sangre del mamífero infectado, los tripomastigotes pasan al insecto, dentro del cual cambian a dos formas replicativas epimastigotes y esferomastigotes. Estos proliferan por división celular y, llegando al recto, se diferencian a la forma infectiva que es el tripomastigote metacíclico, cuando el insecto defeca sobre la piel en las heces se encuentran los tripomastigotes

metacíclicos, que entran al hospedero mamífero cuando la piel está dañada o por el orificio que dejó al succionar la sangre, también pueden entrar por mucosas. Dentro del mamífero, el tripomastigote se disemina a varios tejidos por medio de la sangre y penetra a las células y se transformado en amastigote, éste se multiplica intracelularmente por fisión binaria, estos amastigotes transformados a tripomastigotes sanguíneos intracelularmente son liberados durante la ruptura celular y pueden infectar nuevas células, los tripomastigotes vuelven a entrar a torrente sanguíneo y reinfectar nuevas células. El insecto Reduviidae es infectado por ingerir tripomastigotes cuando se alimenta de sangre, cerrando el ciclo (Fig. 2).

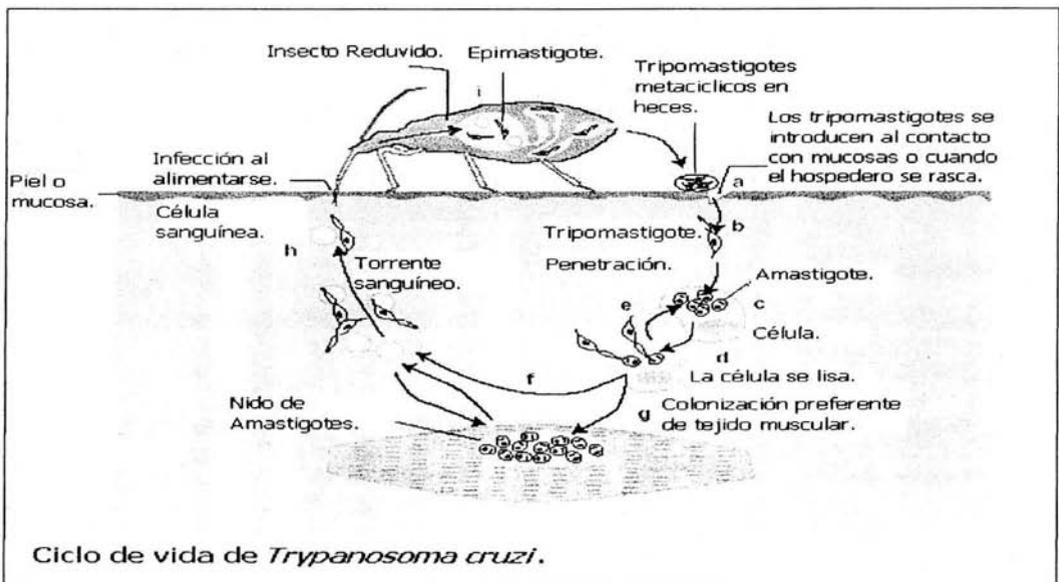


Figura 2. Ciclo de vida de *T. cruzi* (tomado de Macedo y cols., 2002 <http://www-ermm.cbcu.cam.ac.uk>).

1.2.d. Caracterización de las cepas de *Trypanosoma cruzi*.

En años recientes, la caracterización de *Trypanosoma cruzi* ha sido tema de investigación debido a la gran diversidad entre las cepas de parásito. La utilización de isoenzimas, la secuencia genes del miniexon y los microsatélites han provisto de claras evidencias de que *T. cruzi* aunque es una sola

especie está formada por dos grandes subgrupos divergentes a nivel genético, designados anteriormente como grupo genético 1 y 2. El grupo genético 1 predomina en el ciclo selvático mientras que, el grupo genético 2 principalmente está presente en el ciclo doméstico. Mediante electroforesis con enzimas multilocus y amplificación al azar de DNA polimórfico (RAPDs), se ha podido subdividir el grupo genético 2 en cinco subgrupos diferentes, mientras que el grupo genético 1 no se ha podido subdividir, ambos linajes son potencialmente patogénicos para el hombre (Macedo y cols., 2002 <http://www-ermm.cbcu.cam.ac.uk>).

Es importante mencionar que la correlación entre la división de *T. cruzi* basada en DNA r y secuencia de genes del mini-exon, los cuales fueron corroborados por análisis de RAPDs de las cepas, permitió la definición de los dos principales linajes filogenéticos mayores (Briones y cols., 1999), las bases de la división se soportan principalmente en marcadores bioquímicos y moleculares y las dos líneas son recientemente denotadas como *T. cruzi* I y *T. cruzi* II. *T. cruzi* I es equivalente al grupo Z1 de Miles (Miles y cols., 1977) y linaje 2 de Souto (Souto y cols., 1996), estas cepas pertenecen principalmente al ciclo selvático de transmisión de la Enfermedad de Chagas, inducen bajas parasitemias en pacientes chagásicos humanos y también en infección experimental en ratón. Por el contrario, *T. cruzi* II corresponde a Z2 de Miles y linaje 1 de Souto. Las cepas pertenecientes a este linaje están relacionados con el ciclo doméstico de transmisión de Chagas, y son asociados con mamíferos placentarios y estas causan altas parasitemias, también causan infecciones en humano en áreas endémicas (Macedo y cols., 2002 <http://www-ermm.cbcu.cam.ac.uk>).

Por otro lado, algunas cepas sudamericanas de *T. cruzi* ya se han caracterizado parcialmente y se ha encontrado alta variabilidad entre ellas a nivel biológico, bioquímico y molecular, pero falta saber más sobre las cepas mexicanas. En cuanto a esto último se han analizado mediante técnicas como RAPDs para conocer la variabilidad de las poblaciones de *T. cruzi* y se ha determinado una predominancia de *T. cruzi* 1 en las cepas mexicanas, mientras que en el caso de las cepas

Sudamericanas existen los dos grupos *T. cruzi* 1 y 2 (Bosseno y cols., 2002). En nuestro laboratorio se han caracterizado genética y biológicamente cepas mexicanas de *T. cruzi* y se cuenta con alrededor de 100 aislados de *T. cruzi* de diferentes orígenes tanto de humano como de vector y de reservorio (Espinoza y cols., 1998; López-Olmos y cols., 1998).

I.3. LA ENFERMEDAD DE CHAGAS.

La enfermedad de Chagas es muy compleja, la variabilidad y severidad en los síntomas de la enfermedad pueden ser debido a muchos factores entre ellos se encuentran la cepa de parásito infectante (Espinoza y cols., 1998).

Se pueden reconocer dos fases la fase aguda y la fase crónica, aunque también existe una fase asintomática indeterminada que resulta difícil de reconocer si no se tienen antecedentes de síntomas de la fase aguda (Andrade, 1999).

I.3.a. Fase aguda.

Durante su fase aguda se puede ver una lesión inflamatoria local, algunas veces cuando la transmisión fue por triatomíneos que pican en el ojo, se manifiesta el signo de Romaña (complejo oftalmoganglionar) que consiste en una blefaritis indolora, con edema (por incremento de permeabilidad capilar periférica), reacción conjuntival y ganglionar satélite, o bien chagomas de inoculación si el insecto pica en otras partes del cuerpo, los que se pueden definir como nodulaciones duras, eritemo-papulosas que pueden presentar pequeñas vesículas. Este periodo se caracteriza por una alta parasitemia y la fiebre es el signo más importante observado en el 95% de los casos agudos, con picos vespertinos que están relacionados con la parasitemia y generalmente acompañada de cefalea, astenia, malestar general y mialgias. El parásito es fácil de detectar por métodos parasitológicos directos como observación directa de sangre fresca (frotis o gota gruesa), también durante el período agudo de la enfermedad se presenta leucocitosis moderada con predominio de

mononucleares (linfocitos y monocitos). Los eritrocitos y la hemoglobina descienden a veces en forma importante, esta fase es corta con duración de 4 a 8 semanas (Dusanic, 1991., Velasco y cols. 1991).

I.3.b. Fase crónica indeterminada.

Comienza 8 a 10 semanas después de la fase aguda y puede durar varios años (OMS, 1991). El paciente carece de síntomas clínicos y al parecer goza de buena salud. Las pruebas serológicas son positivas y se detectan los parásitos en la sangre por hemocultivo y xenodiagnóstico. Puede presentar baja o nula parasitemia (Buscaglia y Di Noia, 2003), además se pueden empezar a detectar ligeras anomalías electrocardiográficas y radiológicas del corazón, esófago y colon (Santos-Buch y Acosta., 1985., Dusanic., 1991., Rassi y Luquetti., 1992).

I.3.c. Fase crónica sintomática.

La fase crónica sintomática, es caracterizada por insuficiencia cardíaca, clínicamente varía de acuerdo al grado de insuficiencia cardíaca o al tipo de alteración del ritmo. Los síntomas más comunes son las palpitaciones y la disnea. Las palpitaciones son el síntoma más común y a menudo la única perturbación subjetiva sugerida por el enfermo. Generalmente esta molestia es provocada por el esfuerzo o las emociones, raramente ocurre durante el reposo (Velasco y cols., 1991). Se ha visto que se presenta microvascularización inducida por el parásito originando degeneración de miocitos e inflamación crónica (Morris y cols; 1990; Petkova y cols., 2001). También ocurre una activación policlonal de células B que puede interrumpir mecanismos de regulación normales del sistema inmune y causar ambas, inmunosupresión y autoinmunidad (Minoprio, 2001). Además la persistencia de antígenos de *T. cruzi* puede actuar como foco de hipersensibilidad mediada por células T, proceso que provoca daño en el tejido del hospedero (Ben Younes-Chennoufi y cols. 1988., Tarleton y Zhan., 1999., Tarleton, 2001;).

I.4. EPIDEMIOLOGÍA.

La forma más común de adquirir la enfermedad es a través de la picadura del *Triatoma* y mediante transfusión de sangre. La incidencia es grande en zonas rurales, especialmente las más desprotegidas facilitando la invasión del vector. La Tripanosomiasis Americana afecta a perros, gatos, roedores, armadillos, murciélagos y otros mamíferos, los cuales son fuente importante de transmisión (Bogitsh y cols. 1998).

Ciclos de transmisión por triatóminos.

Se trata de ciclo silvestre o enzootico; lo que significa que los triatóminos silvestres prefieren hospederos animales y sólo ocasionalmente pican al hombre. Existe además un ciclo peridoméstico, intermedio o zooantropótico: que consiste en aquellos triatomos que habitan en las cercanías de la vivienda humana como gallinero, pocilgas, etc. y que han iniciado la colonización de ésta. También se presenta un ciclo doméstico, domiciliario o antropótico: se trata de triatóminos que tienen como principal fuente de alimento al hombre aunque no desdeñan animales domésticos o silvestres (murciélagos, tacuaches, ciertos roedores, etc.) y que viven en la habitación humana o penetran a ella. Se sabe que los humanos son el hospedero más reciente de *T. cruzi*. Se estima que originalmente infectaba mamíferos primitivos dispersos a través de Laurasia y Gondwana, teniendo su primer contacto con humanos en el Pleistoceno, según evidencia de DNA de *T. cruzi* en momias exhumadas (Macedo y cols., 2002 <http://www-ermm.cbcu.cam.ac.uk>).

I.5. INTERACCIÓN PARÁSITO CÉLULA HOSPEDERA.

En los procesos de infección a las células hospederas intervienen varios eventos entre los cuales están involucrados eventos de señalización dependiente de Ca^{2+} , que se llevan a cabo por cambios transitorios de niveles de Ca^{2+} en respuesta al tripomastigote, como consecuencia se dan reacomodos en los microfilamentos de actina y fusión de lisosomas de la membrana plasmática (Rodríguez y cols., 1995, 1997). Inicialmente, los niveles de Ca^{2+} son transitorios y lentos debido a la presencia del

tripomastigote vivo (Moreno y cols., 1994; Tardieux y cols., 1994; Caler y cols., 2000), lo que indica que la proximidad del parásito a la célula hospedera es necesario para que el parásito inicie la señalización de Ca^{2+} (Caler y cols., 2000; Scharfstein y cols., 2000). Además, se ha sugerido que la fibronectina actúa como puente para facilitar la unión y entrada del parásito a la célula hospedadora y se ha visto que todos los estadios de *T. cruzi* son capaces de unirse a la fibronectina por ensayos "in vitro" en donde se ha observado aumento de esta unión entre el parásito y las células blanco (Ouaisi y Capron, 1989). También, se ha identificado una transialidasa de superficie presente en el tripomastigote capaz de transferir ácido siálico exógeno al epítipo Ssp3 específico del estadio. Schenckman y cols (1991) postulan que la actividad trans-sialidasa, de esta enzima provee al epítipo Ssp3 el grupo necesario para el reconocimiento y la invasión de la célula blanco. Por otro lado, se sugiere que *T. cruzi*, una vez dentro de la célula hospedadora está contenido en vacuolas ácidas y después de 1 o 2 horas, los parásitos alteran la membrana vacuolar y quedan libres en el citoplasma para su replicación, este evento requiere de un medio ácido, que libere la proteína funcional formadora de poros (TcTox) que es secretada por el amastigote y que participa en la ruptura de la vacuola, esta es activa a un pH bajo y además es inmunológicamente relacionada con el factor C9 del complemento humano (Ley y cols., 1990; Andrews y cols., 1990).

1.6. MECANISMOS DE RESPUESTA INMUNE

1.6.a. Anticuerpos.

Todos los anticuerpos tienen una estructura central común de dos cadenas ligeras idénticas, [de aproximadamente 24 kilodalton (kD) cada una] y dos cadenas pesadas idénticas de 55 a 70 kD. A pesar de su gran parecido en su estructura general, los anticuerpos pueden dividirse fácilmente en un pequeño número de clases y subclases distintas basándose en diferencias menores de sus características fisicoquímicas como tamaño y carga. Muchas de las funciones de los anticuerpos están mediadas por las porciones Fc, y son por lo tanto, específicas de cada isotipo o subtipo en particular.

Los anticuerpos, las moléculas del complejo principal de histocompatibilidad MHC y los receptores para el antígeno de la célula T constituyen tres clases de moléculas que utiliza el sistema inmunitario para reconocer específicamente a los antígenos, de estas tres, los anticuerpos poseen la mayor capacidad para reconocer estructuras antigénicas, discriminar entre antígenos diferentes y la mayor fuerza de unión al antígeno.

Se sabe que los anticuerpos son producidos por los linfocitos B, y están contenidos dentro de compartimentos unidos a la membrana citoplasmática (retículo endoplásmico y complejo de Golgi) y están presentes sobre la superficie de los linfocitos B. También se sabe que están unidos a la superficie de determinadas células inmunitarias efectoras, como los fagocitos mononucleares, células asesinas naturales (NK por sus siglas en inglés) y mastocitos, que no sintetizan anticuerpos, pero poseen receptores específicos para unir anticuerpos (Abbas y cols., 2001).

Durante la fase aguda de la infección con *T. cruzi* se ha visto que el sistema inmune del hospedero es movilizado para generar estimulación y activación policlonal de linfocitos y se ha sugerido que la activación policlonal de células B nos indican una marcada producción de inmunoglobulina Ig parásito-específico que al final de la fase aguda esta producción de anticuerpos parásito-específico llegan a relacionarse con un incremento de la resistencia del hospedero y una significativa protección ante la infección. Por otro lado, se ha visto durante muchos años que los anticuerpos son muy importantes en el control de la fase crónica de la infección con *T. cruzi*, varios investigadores (Brener, 1980; Brener y Krettli, 1990., Tarleton, 1997), han mostrado que los anticuerpos inducen protección en ratones crónicamente infectados. Es importante mencionar dos actividades biológicas de los anticuerpos anti-*T. cruzi* que han observado, la primera es inducir lisis del parásito y por otro lado inducir eliminación de parásitos cuando se inyectan junto con formas de tripomastigotes dentro de ratón normal (Umekita, y cols., 1988). También se han utilizado para la caracterización de antígenos del parásito, que son blanco de anticuerpos líticos. Se ha sugerido que

algunos antígenos pueden ser moléculas que propician la interacción de C3b con el factor B del complemento, suprimiendo la formación de convertasa C3. En este caso específico los anticuerpos inhiben esta actividad de suprimir la formación de convertasa C3 y por tanto, hacen susceptibles a los tripomastigotes a lisis (Umekita y Mota, 2000).

Es evidente que diversas poblaciones celulares pueden ser responsables de la eliminación de *T. cruzi* de la circulación, y que el papel protector de los anticuerpos con habilidad de inducir la eliminación del parásito *in vivo* es dependiente de la presencia de correspondientes eventos mediados por células (Umekita y Mota, 2000).

I.6.b. CÉLULAS.

Las células del sistema inmunitario están representadas, entre otras, por los linfocitos, que son células que reconocen y responden a antígenos extraños. En las fases iniciales de su desarrollo, los linfocitos no producen receptores de superficie, debido a que se encuentran inmaduros.

El linfocito T mide de 8 a 10 micras (μm) de diámetro, los precursores vienen de la médula ósea y después migran y maduran en el timo, en este se asegura que todo linfocito T que sale del timo no reaccione contra las proteínas ni contra otros antígenos presentes en los tejidos propios. Sin embargo, las fases de reconocimiento y activación de respuestas inmunitarias dependen de las células no linfoides, llamadas accesorias, entonces los linfocitos y las células accesorias están organizados en órganos linfoides, donde interactúan entre sí para iniciar y amplificar la respuesta inmunitaria, esta activación da como resultado generación de mecanismos efectores que requieren de la participación de células como linfocitos T activados, fagocitos mononucleares y otros leucocitos (Abbas y cols., 2001).

Durante las respuestas inmunitarias intervienen varios mecanismos entre ellos las células CD4^+ y CD8^+ , que son moléculas accesorias de células T que se unen específicamente a otras moléculas (ligandos) presentes en la superficie de otras células, como células presentadoras de antígeno (APC),

células diana o endotelio vascular, o a moléculas de la matriz extracelular, entre ellas proteínas y proteoglicanos. Los linfocitos CD4⁺ y CD8⁺ son comúnmente llamados co-receptores y participan en la transducción de señales tempranas que tiene lugar tras el reconocimiento de la célula T de los complejos péptido-MHC sobre APC.

Diversos estudios de la infección producida por *T. cruzi*, sugieren que durante la respuesta inmune montada contra la parasitemia local y en el daño al tejido intervienen las células CD4⁺ y CD8⁺, y que la reacción cruzada de las células T con los antígenos anti-*T. cruzi* podrían amplificar los procesos destructivos en tejido (DosReis, 1997). Otros experimentos indican que, durante la fase aguda de la infección con *T. cruzi*, cuando los parásitos desaparecen de circulación, hay una notable predominancia de infiltrados de linfocitos CD8⁺ en corazón, esto sugiere un posible papel de las células CD8⁺ en el control del parásito, posteriormente durante la fase intermedia y crónica de la infección, el porcentaje de CD4⁺ se incrementa y suplementa el porcentaje de células CD8⁺, por tanto se ha visto que estas células CD8⁺ están asociadas con miocitos que inducen cambios degenerativos (Soares y cols., 2001). También se sabe que durante la resistencia del hospedero a la infección experimental de la enfermedad de Chagas, hay una dependencia de la respuesta inmune adquirida e innata y en esta intervienen también células NK, células CD4⁺ y CD8⁺, así como de anticuerpos producidos por células B (Müller y cols., 2001).

Otro mecanismo de resistencia contra el parásito, este es la producción de citocinas con función reguladora, cuyo tema se abordará en el siguiente apartado.

I.6.c. Citocinas.

En la inmunidad innata las citocinas efectoras son producidas principalmente por los fagocitos mononucleares, estas citocinas también son conocidas como monocinas y provocan reacciones inflamatorias con abundancia de neutrófilos que sirven para contener y erradicar las infecciones (Abbas y cols., 2001).

Las citocinas se producen durante las fases de activación y efectora de la inmunidad innata y específica, y sirven para mediar y regular las respuestas inflamatoria e inmunitaria. En general las citocinas no se almacenan como moléculas preformadas y su síntesis se inicia mediante una nueva transcripción génica. La combinación de un periodo corto de transcripción con un transcrito RNAm de vida corta asegura que la síntesis de citocinas sea transitoria. Es posible que algunas citocinas sean controladas adicionalmente por mecanismos post-transcripcionales, como la liberación proteolítica de un producto activo a partir de un precursor inactivo. Una vez sintetizadas, las citocinas se secretan rápidamente lo que resulta en un pico de liberación en el momento en que son necesarias (Abbas y cols., 2001).

Se ha visto que la respuesta inmune estimulada por infecciones puede ser del tipo Th1 o Th2, dependiendo principalmente de las citocinas secretadas. El primero se asocia con la inmunidad mediada por células y la activación de macrófagos, mientras que en la segunda participa la respuesta humoral. Una respuesta Th1 está caracterizada principalmente por la presencia de IFN- γ en altos niveles, TNF- β e IL-2, así como IL-12, mientras que la respuesta Th2 está caracterizada por la presencia de IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10 e IL-13 (Antúnez y Cardoni, 2000).

Actualmente se sabe que IL-12 es un potente inductor de la producción de INF- γ , tanto por células T como por células NK, su subunidad 40 Kda presenta un dominio tipo Ig y dos motivos de cisteína/WSXWS. La síntesis de IL-12 está restringida a fagocitos mononucleares activados y a células dendríticas. Se ha visto que dentro de las acciones biológicas que tiene IL-12 sobre células NK y células T está la inducción de secreción de INF- γ , también actúa como factor de diferenciación para células T CD4⁺ favoreciendo su especialización en células tipo Th1 productoras de INF- γ que ayuda en la inmunidad mediada por fagocitos, también aumenta la actividad citolítica de las células NK activadas y de las células CD8⁺ (Abbas y cols., 2001).

INF- γ también llamado interferón tipo II o inmunitario, es una glicoproteína homodímera que contiene dos subunidades de entre 21 a 24 kD, la variación en tamaño de las subunidades se debe a los grados de glucosilación, pero cada subunidad contiene un polipéptido idéntico de 18 kD codificado por el mismo gen. INF- γ es un potente activador de los fagocitos mononucleares que inducen directamente la síntesis de enzimas que median el estallido respiratorio, permitiendo que los macrófagos humanos destruyan microorganismos fagocitados. En los macrófagos murinos el INF- γ actúa coordinadamente con TNF induciendo la isoforma de alta producción de la sintasa de óxido nítrico, lo que permite la producción copiosa de radicales NO que tienen efectos similares a los radicales reactivos de oxígeno sintetizados por los macrófagos humanos. Durante la respuesta inmunitaria, el INF- γ amplifica la fase de reconocimiento favoreciendo la activación de las células T CD4⁺ restringidas por MHC II. Este comportamiento se ha visto en infecciones experimentales con *T. cruzi* (Gomes y cols., 2003). También se ha reportado, en infecciones experimentales, que el INF- γ actúa sinérgicamente con TNF- α para controlar el crecimiento del parásito (Tarleton, 1990). Los ratones deficientes en el receptor para INF- γ (INF- γ R^{-/-}) o NO sintetiza indetectable (Inés^{-/-}) son altamente susceptibles a la infección por *T. cruzi* mostrando una exacerbación de la parasitemia y gran mortalidad (Mujer y cols., 2001). En ratones infectados con *T. cruzi* se ha observado que, la citosina IL-12 es necesaria para una efectiva respuesta inmune y es importante para la síntesis de INF- γ . Sin embargo, las células T CD4⁺ específicas son capaces de producir INF- γ independientemente de la producción endógena de IL-12, ya que se ha observado que IL-18 es capaz de mediar la producción de INF- γ dependiente de células T en ausencia de IL-12 endógeno (Müller y cols., 2001). También se ha visto que la administración exógena de INF- γ incrementa la resistencia (Reed, 1988), mientras que el tratamiento con anticuerpos anti-INF- γ hacen al ratón más sensible a la infección (Torrice y cols., 1991). Por otro lado, se ha demostrado el importante papel de IL-12/INF- γ /Óxido nítrico sintetasa inducible (iNOS), y el papel del efecto antagónico de IL-4, en la regulación de la

replicación del parásito en tejido cardíaco y resistencia del hospedero a *T. cruzi*. También se ha demostrado que la deficiencia endógena de IL-12 e IFN- γ es determinante para la reactivación de la infección en sistema nervioso central y tejido cardíaco (Michailowsky, y cols., 2001).

Dentro de las funciones que se han visto de la citocina son todavía contrastantes sugiriendo por un lado un rol dual dentro del cual durante la fase aguda de la infección con *T. cruzi* en pacientes el IFN- γ puede actuar sinérgicamente para eliminar al parásito y por otro lado, durante la fase crónica hay una exacerbación de la enfermedad con una falta de control en la producción de IFN- γ y se ha observado principalmente en tejido cardíaco que promueve destrucción citolítica del miocardio. Sin embargo, en modelo murino se ha visto que cuando hay disociación entre inflamación y parasitismo en tejido puede depender de un fino balance de la respuesta Th, en la cual la respuesta Th1 podría controlar el parasitismo y por otro lado acrecentar la inflamación del corazón durante el curso de la infección (Gomes, y cols., 2003).

La citocina IL-10 también está relacionado con una disminución del efecto protector a la infección con *T. cruzi*, por ejemplo, se ha mencionado que ratones susceptibles a la infección con *T. cruzi*, producen mayor cantidad de IL-10 durante la fase aguda de la infección en comparación con ratones resistentes, los cuales no producen IL-10 (Silva y cols., 1992). Además, IL-10 tiene la capacidad de inhibir algunas de las funciones de macrófagos, incluyendo la activación por INF- γ y la síntesis de óxido nítrico (NO) (Reed y cols., 1994). También se ha observado que, la inducción de TGF- β e IL-10 promueven la sobrevivencia del parásito, resultando en un aumento de la parasitemia y aumentando el desarrollo de la patología (Gazzinelli y cols., 1992). Por otro lado, se han demostrado en pacientes con daño cardíaco con altos niveles de secreción de INF- γ y bajos niveles de IL-10 asociado con desarrollo de daño a tejido, sin embargo un incremento en niveles de IL-10 durante la fase crónica puede ser asociada con protección del hospedero contra una excesiva patología inducida por respuesta tipo Th1 (Gomes y cols., 2003).

Otra de las citocinas importantes durante la infección con *T. cruzi* es IL-4, la cual pertenece al grupo de citocinas reguladoras producidas por células Th2 que son potentes promotores de la respuesta inmune humoral. En varios modelos de infección la respuesta Th1 y Th2 son críticos para la determinación del rumbo de la enfermedad (Soares y cols., 2001). Se ha observado que durante la infección experimental con *T. cruzi* la presencia de IL-4 induce un incremento de la susceptibilidad en ratones Balb/c (Frederick, 1995). Además, cuando IL-4 sinergiza con IL-10 se convierte en un poderoso modulador de la secreción de IFN- γ y de la activación de respuesta la Th1 durante la infección (Abrahamsohn y cols., 2000). En la cardiopatía Chagásica en modelo murino, se ha demostrado que los focos de inflamatorios en corazón se incrementan cuando se depleta IL-4 y en este mismo ratón repletado las alteraciones cardiacas disminuyen pero principalmente propicia una intensificación de la respuesta Th1, y esta respuesta Th1 se ha visto que puede ser más agresiva que la respuesta Th2 para tejidos del hospedero (Soares y cols., 2001).

Existe otro punto de vista con respecto a las citocinas involucradas en la susceptibilidad, por ejemplo IL-10 que originalmente fue denominada factor inhibidor de la secreción de citocinas y que antagoniza con citocinas activadoras de macrófagos pudiendo inhibir la síntesis de TNF- α , IL-12 por macrófagos y de IL-2 e IFN- γ por linfocitos (Mosmann, 1994), tiene un papel complejo y en ocasiones contradictorio, ya que así como puede permitir la proliferación del parásito, también la falta total de IL-10 se asocia con patología debida a una respuesta tipo Th1 exagerada, como en el caso de enfermedades inflamatorias intestinales o en reacciones de alta susceptibilidad a choque séptico debido a bacterias, es decir, para la primera fase de la infección con este hemoflagelado, existe un requerimiento crítico de IL-10 para prevenir el desarrollo de una respuesta inmunológica patológica asociada con linfocitos T CD4⁺ y alta producción de IL-12 (Hunter y cols.,1997).

Según las observaciones realizadas por Dutra y cols, 1997, el papel de la citocina IL-10 en humanos es muy semejante al papel que presenta en los modelos murinos, por lo cual se piensa que

en un futuro se podría establecer alguna terapia basada en la acción moduladora de esta citocina. La participación de las citocinas es determinante en el curso de la infección con *T. cruzi*. También se ha demostrado que altos niveles de interleucina 5, IL-10, IL-13 e IFN- γ y si estas citocinas están balanceadas puede ser la clave del control durante una enfermedad crónica (Gomes y cols., 2003).

En resumen, en modelo murino y en el hombre no existe patrón de citocinas polarizado en la infección con *T. cruzi*, sino que hay una mezcla de ambos tipos de respuesta (Th1 y Th2), lo que hace suponer que en esta infección, se requiere de controlar al parásito, y también se requiere de un control de la respuesta inmunológica del hospedero evitando así la inmunopatología (DosReis, 1997). Además, durante el curso de la infección en modelo murino se dan grandes similitudes con la infección en el hombre, presentándose una fase aguda y una fase crónica bien caracterizadas, aunque existen algunas dificultades en correlacionar los efectos durante la fase crónica en humanos y ratón, el modelo murino es de los más estudiados tanto en la enfermedad de Chagas, como en otras enfermedades autoinmunes (Acosta y Santos-Buch, 1985).

II. JUSTIFICACIÓN.

Trypanosoma cruzi es el agente causante de la enfermedad de Chagas. Dentro del trabajo por conocer este parásito se han estudiado diferentes características, entre las cuales está la caracterización genética, encontrando que las cepas mexicanas pertenecen a genotipo 1. También es importante mencionar la importancia de la alta variabilidad genética dentro de un mismo genotipo, además de una variación en cuanto a grados de virulencia entre las cepas, ya que algunas pueden matar al hospedero y otras, solo causan daños leves por los que el hospedero puede sobrevivir. Durante este fenómeno por controlar la infección, se activan mecanismos de defensa como las citocinas, entre otros, sobre los que influyen la variabilidad del la cepa del parásito y la susceptibilidad del hospedero, ya que algunas cepas de parásito resultan ser más virulentas que otras y es importante conocer el papel de las citocinas en particular en la infección con cepas mexicanas de *T. cruzi*.

III. OBJETIVOS

OBJETIVO GENETRAL

Determinar el patrón de citocinas tipo Th1 y Th2, en suero y sobrenadante de células de bazo de ratones infectados con dos cepas Mexicanas de *Trypanosoma cruzi* que exhiben diferentes grados de virulencia.

OBJETIVOS PARTICULARES

Determinar el grado de virulencia en ratones Balb/c infectados con diferente inóculo (10 mil y 100 mil parásitos) de cepas mexicanas de *Trypanosoma cruzi*.

Cuantificar la parasitemia en circulación y la producción de anticuerpos específicos IgG anti-*T. cruzi*.

Determinar el patrón de citocinas Th1 (IL-12p40, IFN- γ) y Th2 (IL-10, IL-4) presente en el suero de los ratones infectados con cepas de diferente virulencia.

Evaluar el patrón de citocinas Th1 (IL-12p40, IFN- γ) y Th2 (IL-10, IL-4) presentes en sobrenadante de células de bazo de ratones infectados con estas cepas.

IV. MATERIAL Y MÉTODO.

IV.a. Animales.

Se utilizaron ratones hembras Balb/c de 6 a 8 semanas de edad, estos ratones fueron criados en el Bioterio del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM. Los grupos de ratones se mantuvieron con agua y alimento *ad libitum* en cajas con 6 ratones y fueron mantenidos en condiciones libre de patógenos siguiendo los principios de ética en el uso de animales de laboratorio (Suckow y cols., 2001).

IV.b. Cepas e infección.

Las cepas utilizadas se obtuvieron del cepario de *T. cruzi* que se mantienen en el laboratorio de la Dra. Bertha Espinoza Gutiérrez que contiene alrededor de 100 aislados diferentes, de estos aislados la mayoría ya han sido caracterizado genéticamente (Espinoza, y cols. 1998; López-Olmos, y cols. 1998; Bosseno, y cols. 2002). Las cepas utilizadas se mantuvieron mediante pases sucesivos en ratones BALB/c, en el caso de la cepa que se le denominó la letra A cada 28 días y para la cepa llamada B cada 18 días. La infección de los ratones se hizo vía intraperitoneal en 9 a 12 ratones para cada grupo experimental ya sea con 10 mil o 100 mil parásitos. Estos parásitos fueron inoculados en un volumen de 200 μ l de PBS estéril para cada grupo experimental y el grupo control se inoculó sólo con PBS estéril. Se realizaron al menos tres repeticiones independientes (Caballero, 1996).

IV.c. Supervivencia.

La supervivencia se evaluó, revisando diariamente las jaulas que contenían a los ratones infectados y controles. La supervivencia se obtuvo dividiendo el número de los ratones muertos entre el número de ratones que inicialmente se tenían y multiplicando este valor por 100, (López-Olmos, y cols. 1998). En total se mantuvo en observación 28 ratones por cada inóculo en total 56 ratones por cada cepa utilizada.

IV.d. Parasitemia.

Se obtuvo sangre de los ratones del grupo experimental y del grupo control mediante punción del plexo ocular utilizando un tubo capilar con heparina de 75 mm de diámetro (marca LAUKA No. de Cat. 51608). La parasitemia fue analizada individualmente cada tercer día, teniendo cuidado de alternar a los animales para evitar una posible anemia. La cuantificación de los parásitos se realizó mediante la observación al microscopio óptico, la observación se realizó en gota directa de 10 μ l, en los primeros 2 a 6 días de la infección ya que la parasitemia era muy baja, o bien, utilizando un hemocitómetro con diluciones de 1:20 y 1:50 del suero, para determinar la cantidad de parásitos con mayor precisión en etapas más tardías de la infección.

IV.e. Determinación de anticuerpos.

Para determinar la presencia de anticuerpos en suero de los ratones infectados con ambas cepas y controles se obtuvo el suero cada tercer día a partir de sangre. La sangre se mantuvo durante 30 min a 37°C, después a 4°C durante 2h, posteriormente se centrifugó a 350 g por 10 min. La presencia de anticuerpos fue determinada mediante la técnica de ELISA indirecto, para la cual se usaron pools de 3 a 6 ratones por día de sangrado durante todo el tiempo que duró la infección.

La técnica de ELISA empleada para este ensayo fue descrita inicialmente por Voller, Bidwell y Barlet, 1979 y modificada para detectar anticuerpos anti-*T. cruzi* por Rangel-Flores, y cols, en 2001. Se utilizaron placas de 96 pozos (EIA RIA 3590, Costar), las cuales se sensibilizaron con una solución de extracto total de epimastigotes (cepa A o B) diluida en amortiguador de carbonatos 0.1 M, pH 9.6 a una concentración de 5 μ g/pozo durante 2 h a 37°C preparado según se describe en Rangel-Flores, y cols, en 2001. Después de la incubación en cámara húmeda, los pozos se lavaron con 200 μ l de PBS tween al 05%, tres veces durante cinco minutos en cada lavado, después para bloquear los sitios de pegado inespecífico se agregó albúmina diluida en PBS 1%, durante 1 h en cámara húmeda. Una vez bloqueado, se añadieron en 100 μ l, el suero de los ratones infectados a una dilución de 1:50,

incubando durante toda la noche en cámara húmeda a 4°C, los pozos se lavaron como ya se dijo anteriormente, para posteriormente agregar 50 µl por pozo del segundo anticuerpo anti-IgG (cadena pesada y ligera) anti-ratón unido a peroxidasa (ZYMED No. de catálogo 61-620), diluido 1:1000 en PBS tween 20 al 0.05% y se incubó durante 2 h. Nuevamente se lavó como ya se indicó anteriormente. Posteriormente, la reacción en las placas se reveló con 100 µl de solución de sustrato que contenía 4µl de H₂O₂, 4mg de Ortofenil diamina (SIGMA), 5ml de solución amortiguadora de citrato-fosfato pH 5 y 5ml de H₂O destilada, se incubó a temperatura ambiente durante 10 min aproximadamente, para que de una reacción colorida, cuidando que los controles negativos permanezcan sin color. Finalmente, se paró la reacción con 50 µl por pozo de H₂SO₄ al 2.5N. Se leyó a 490 nm en un lector de ELISA (Bio-Rad Modelo 550). En todas las pruebas se incluyeron como controles negativos sueros de ratones preinmunizados y como controles positivos sueros de ratones hiperinmunizados.

IV.f. Proliferación de células de bazo.

Se realizaron ensayos de proliferaciones de células de bazo de los ratones infectados y se determinó la capacidad de división que presentaron estas células ante un estímulo específico. Los ensayos se estandarizaron a los 15 días postinfección (p.i.) para los ratones infectados con la cepa virulenta y a los 21 días p.i. en los ratones infectados con la cepa avirulenta, la diferencia en cuanto al tiempo en los grupos se debió principalmente a que en el día 15 y 21 la parasitemia se encontraba en ascenso en ambos grupos de ratones infectados. También se realizó el ensayo durante la fase crónica (día 98 p.i.) solo en los ratones infectados con la cepa avirulenta que son los únicos que alcanzaron esa etapa. Se obtuvieron los linfocitos que provenían del bazo de ratones infectados y linfocitos que provenían de ratones controles sin infectar. Se analizaron cada vez los bazos de por lo menos 3 ratones de cada grupo infectado con diferente cantidad de inóculo, se repitieron los experimentos por lo menos 3 veces. La técnica ha sido reportada con anterioridad (Pinge-Filho, 1999). Brevemente, los

ratones fueron sacrificados por dislocación cervical y los bazos de ratones infectados y controles se obtuvieron quirúrgicamente y en condiciones de esterilidad, se enjuagaron con medio de cultivo estéril RPMI complementado con suero fetal bovino al 10 %, L-glutamina al 1 %, aminoácidos no esenciales al 1 %, piruvato al 1 %, vitaminas al 1 %, antibióticos al 1 % (Apéndice I). Se disgregaron los bazos de los ratones, se colectó el medio que contenía las células en tubos falcon de 15 ml estériles, se dejó reposar por 20 minutos en hielo, se tomó el sobrenadante y se centrifugó a 250 gs a 4°C durante 10 minutos, se desechó el sobrenadante y al paquete celular se le agregaron 3 ml de solución de lisis (ACK) (Apéndice I), se dejó actuar durante 3 minutos a 4°C con agitación suave, después se le agregaron 5 volúmenes de RPMI, se centrifugó durante 10 minutos a 250 gs y se descartó el sobrenadante. El paquete celular se resuspendió en 5 ml de RPMI, se contó el número células en hemocitómetro y se ajustó el número a 200 mil células /100 μ l por pozo. Se colocaron en placas Costar de 96 pozos de baja evaporación (Corning Incorporated No. Cat. 3595). Estas placas se colocaron en incubadora a 37° C. con 5% de CO₂ y 90% de humedad, durante 48 horas (Pinge-Filho, y cols., 1999). Finalmente se colectó el sobrenadante cuidando de no llevarse las células que permanecían en el fondo del pozo y fue colocado en tubos eppendorf y se congelaron a -70°C hasta su posterior utilización para medir concentraciones de citocinas Th1 (IL-10, IL-4) y Th2 (IL-12p40, IFN- γ).

IV.g. Cuantificación de citocinas en suero de ratones infectados y sobrenadante de células de bazo.

La cuantificación de citocinas IL-4, IL-10, IL-12p40 e IFN- γ se realizó mediante la técnica de ELISA sándwich con kits específicos siguiendo las instrucciones de los proveedores (ENDOGEN Cambridge).

Para la cuantificación de citocinas se hicieron pools de 3 a 6 sueros de ratones infectados y grupos control o sobrenadante de células de bazo de ratones infectados con ambas cepas.

Brevemente, se realiza una curva estándar a partir de una solución stock de cada citocina y se hicieron diluciones de esta solución stock (la concentración varió para cada citocina). Se adicionó 50 μ l de la muestra problema ya fuera suero o sobrenadante de células de bazo y controles, diluida 1:10 por

duplicado, se incubó la placa cubierta con planillas adherentes a temperatura ambiente (20-25°C) durante 1h (varía según la citocina). Se lavó la placa con solución de lavado y se escurrió sobre papel secante dando pequeñas palmadillas, para evitar residuos de la solución de lavado, esto se realizó de tres a cinco veces, se agregaron 100 µl por pozo de anticuerpo unido a biotina anti-la citocina diluido (según la citocina). Se incubaron las placas cubiertas con laminillas adherentes a temperatura ambiente (20 - 25°C) esta incubación varió según la citocina. Se lavaron las placas como ya se mencionó anteriormente, adicionar 100 µl de Streptoavidina - HRP (Horseradish Peroxidase) y se incubaron las placas durante 30 min (varió según la citocina). Se adicionó 100 µl del sustrato premezclado TMB (3,3',5,5' tetramethylbenzidine) y se desarrolló la reacción a temperatura ambiente (20 - 25°C) o bien en oscuridad durante 30 min según la citocina. Finalmente, se detuvo la reacción adicionando 100 µl de la solución de parado a cada pozo (por lo general consiste en 1 - 2 M de H₂SO₄) y se leyó a 450 nm en lector Ultramicroplate Reader Modelo ELx 808, Bio-tek Instruments Inc. Las concentraciones de cada citocina se calcularon a partir de la curva patrón e interpolado en la curva estándar los valores experimentales y multiplicandos por el factor de dilución que se usó en la muestra y el resultado es la concentración de la citocina en pg/ml. En el caso del sobrenadante de células de bazo de ratones infectados se utilizó el medio de cultivo como diluyente de la solución stock para la curva estándar.

IV.h. Estadística.

Cada uno de los datos graficados en carga parasitaria, porcentajes de sobrevivencia, presencia de anticuerpos y citocinas en suero y sobrenadante de células de bazo representa la media de por lo menos tres animales por grupo, repitiéndose los experimentos 3 a 4 veces. El análisis estadístico se llevó a cabo utilizando una prueba X² con una significancia de P<0.05 (Hays, 1998).

V. RESULTADOS

V.1. DETERMINACIÓN DE LA VIRULENCIA.

Para determinar la virulencia en los ratones BALB/C infectados con ambas cepas y con los dos diferentes inóculos (10 mil y 100 mil parásitos) se monitoreo de 9 a 10 ratones en cada experimento y se realizaron 3 experimentos independientes. En la figura 3, se muestra la virulencia de ambas cepas encontrándose que sólo la cepa B resultó ser 100 % virulenta con ambos inóculos. Los ratones infectados con 100 mil parásitos mostraron la máxima mortalidad el día 54 p.i. y los ratones infectados con 10 mil parásitos alcanzaron esta mortalidad el día 57 p.i. (Apéndice 3 y 4). La mortalidad en los ratones infectados con 100 mil parásitos empezó a manifestarse en promedio el día 18 ± 3.7 p.i. y en los ratones infectados con 10 mil parásitos el día 25 ± 3.0 . Observándose diferencias significativas entre los inóculos analizados sólo en los días en que se empezaron a morir y en los días 21, 25, 26, 29 y 31 p.i. Por otro lado, el 50% de mortalidad en el grupo de ratones infectado con 100 mil parásitos de la cepa virulenta se alcanzó el día 29 p.i., mientras que en ratones infectados con el inóculo de 10 mil parásitos se alcanzó el día 35 p.i., no encontrándose diferencias significativas entre ambos inóculos cuando se dio esta mortalidad media (Figura 3). Debido a los resultados obtenidos desde este momento a la cepa B se le designó como virulenta. Como se observa en la figura 3 los ratones infectados con la cepa A no presentaron mortalidad alguna durante todo el experimento que se monitoreo hasta el día 98 p.i., por tanto, a la cepa A se le designó como avirulenta.

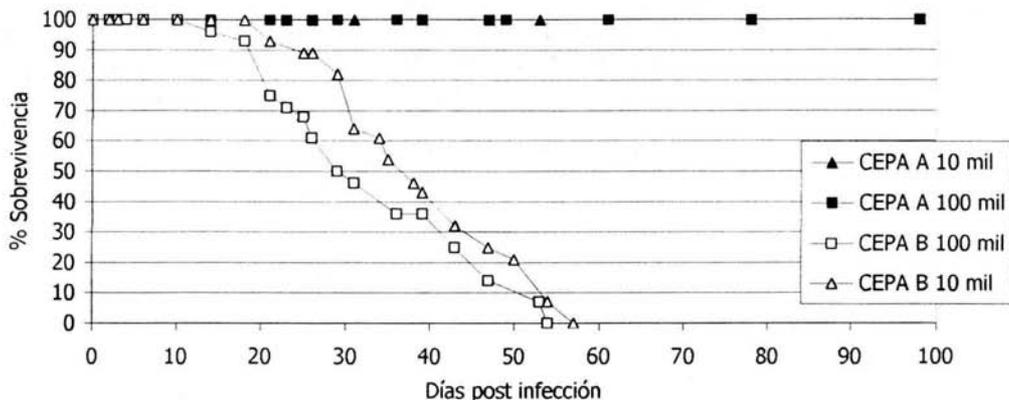


Figura 3. Cinética de la mortalidad de los ratones Balb/c infectados con dos diferentes aislados de *T. cruzi*. Se observa el grupo de ratones infectados con 100 mil parásitos de la cepa B en (□) y el grupo de ratones infectados con 10 mil parásitos de la misma cepa en (△). Por otro lado, el grupo de ratones infectados con 100 mil parásitos de la cepa A en (■) y ratones infectados con 10 mil parásitos de la misma cepa A en (▲). Se realizaron las revisiones diariamente durante 100 días post infección de 28 ratones para cada inóculo y cepa.

V.2. PARASITEMIA.

La parasitemia se determinó en circulación durante la fase aguda de la infección en los ratones infectados con ambas cepas. Como se muestra en la figura 4, en el grupo de ratones infectados con la cepa virulenta con el inóculo de 100 mil parásitos, hubo una aparición temprana de parásitos en circulación en el día 3 ± 0.4 p.i., este grupo presentó un aumento rápido y gradual en el número de parásitos hasta niveles máximos de 4.07 ± 0.527 millones de parásitos por mililitro en el día 26 ± 1.8 p.i. (Apéndice 5) y posteriormente se observó una rápida disminución, hasta que la parasitemia desaparece totalmente en el día 42 ± 7 p.i (Tabla 1). Por otro lado, se observó que en los ratones infectados con la cepa avirulenta, la parasitemia en los ratones infectados con el inóculo de 100 mil parásitos tuvo su aparición el día 5 ± 1.4 p.i. incrementándose gradualmente hasta un máximo de 1.38 ± 0.370 millones de parásitos/ml en el día 26 ± 3.7 p.i. desapareciendo los parásitos en el día 45 ± 4 p.i. (Tabla 1 y figura 4). Las diferencias ente la parasitemia máxima fue significativa entre ambas cepas.

Por otro lado, en los ratones infectados con 10 mil parásitos de la cepa virulenta el día de aparición fue el 3 ± 0.4 p.i. y se observó un máximo de parasitemia de 2.9 ± 0.327 millones de parásitos/ml en el día 31 ± 3 p.i., (Figura 5 y tabla 1) y posteriormente se observó una rápida disminución de los parásitos hasta que desaparece totalmente el día 45 ± 4 p.i. En cambio, en los ratones infectados con la cepa avirulenta los parásitos aparecieron el día 7 ± 1.8 p.i. y llegaron a un nivel máximo de 1.16 ± 0.306 millones de parásitos/ml en el día 28 ± 2.8 p.i. Con este inóculo la parasitemia máxima también presentó diferencias significativas entre ambas cepas (Tabla 1).

Tabla 1. Comportamiento en ratones Balb/c de dos aislados de *T. cruzi*.

Aislado	Grupo	Parasitemia máxima. Millones de parásitos / ml	Día de máxima parasitemia	Día de aparición de parásitos	Día de desaparición del parásito de circulación
Avirulenta	100mil	1.38 ± 0.370	26 ± 3.7	5 ± 1.4	44 ± 3.7
	10mil	1.16 ± 0.306	28 ± 2.8	7 ± 1.8	44 ± 6
Virulenta	100mil	$4.07 \pm 0.527 *$	26 ± 1.8	3 ± 0.4	42 ± 7
	10mil	$2.9 \pm 0.327 *$	31 ± 3	3 ± 0.4	45 ± 4

Se indica el inóculo usado en cada grupo experimental, así como el resultado del análisis de cuatro parámetros de parasitemia. El asterisco indica diferencias significativas en el número de parásitos entre los ratones infectados con la cepa virulenta y ratones infectados con la cepa avirulenta con el mismo inóculo con $P < 0.05$.

V.3. DETECCIÓN DE ANTICUERPOS.

Para la detección de anticuerpos durante las fases aguda y crónica de la infección en el suero de ratones infectados y del grupo control se tomó sangre del plexo ocular y mediante centrifugación se obtuvo el suero. En la Figura 4, se puede observar en el suero de ratones infectados con 100 mil parásitos de la cepa virulenta la aparición de los anticuerpos específicos al final de la primera semana después de la inoculación y conforme avanzó la infección. La presencia de anticuerpos mostró un incremento gradual y llegó a un nivel máximo de 0.674 (de absorbancia) en el día 29 p.i. Los ratones infectados con la cepa avirulenta tuvieron un incremento similar y siguieron aumentando hasta 0.899 (de absorbancia) en el día 78 p.i. que fue el último día que se analizó (Apéndice 9 y 11). No se observaron diferencias significativas entre ambas cepas.

En cuanto a la presencia de anticuerpos en suero de ratones infectados con 10 mil parásitos de la cepa virulenta los anticuerpos presentaron una tendencia a incrementarse (Figura 5) alcanzando niveles máximos de 0.619 (de absorbancia) en el día 29 p.i. En el suero de los ratones infectados con la cepa avirulenta se observaron incrementos similares llegando hasta 1.04 en el día 64 p.i. (Apéndice 10 y 12). Como se pudo observar en este trabajo no se observaron diferencias significativas entre ambos inóculos utilizados, así como no hubo diferencias significativas entre ambas cepas a nivel de anticuerpos. Se puede mencionar que en el inicio y durante la fase aguda de la infección (día 50 p.i.) los niveles de anticuerpos fueron similares, también es importante mencionar que cuando los niveles de anticuerpos van en ascenso, la parasitemia comienza a disminuir de manera rápida, este comportamiento se puede observar en ambas cepas y con ambos inóculos durante la tercera y cuarta semana de la infección.

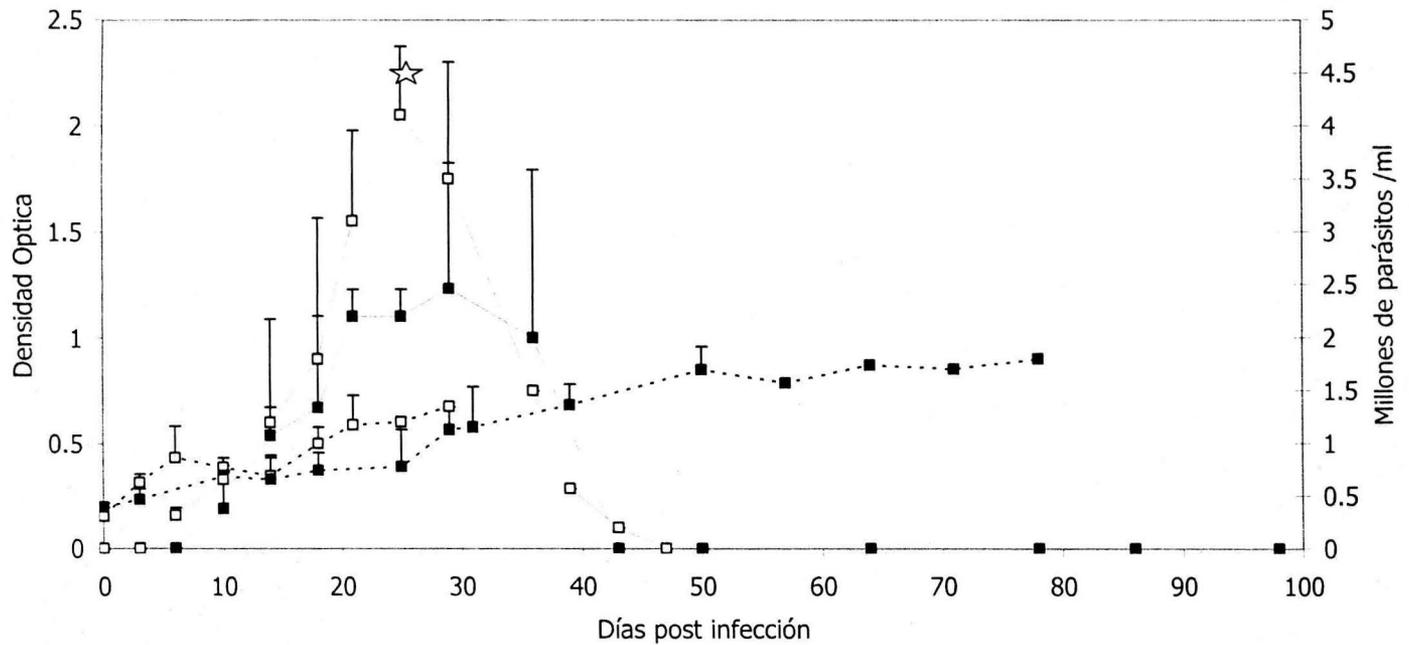


Figura 4. Presencia de anticuerpos y parasitemia de ratones infectados con dos aislados de diferente virulencia de *T. cruzi* con un inóculo de 100 mil parásitos. Se presenta la parasitemia en circulación de ratones infectados con aislado avirulento en (—■—), y anticuerpos en suero de ratones infectados con el mismo aislado en (----■----), también la parasitemia en sangre de ratones infectados con el aislado virulento (—□—) y anticuerpos anti-el mismo aislado (----□----). La sangre para medir la parasitemia fue tomada del plexo ocular cada tercer día y observada al microscopio óptico. Los anticuerpos IgG se determinaron por medio de la técnica de ELISA indirecto utilizando antígeno del parásito ya sea de la cepa virulenta o avirulenta. La estrella indica diferencias significativas en el número de parásitos en circulación entre las dos cepas utilizadas, esto se observó en el día 25 p.i.

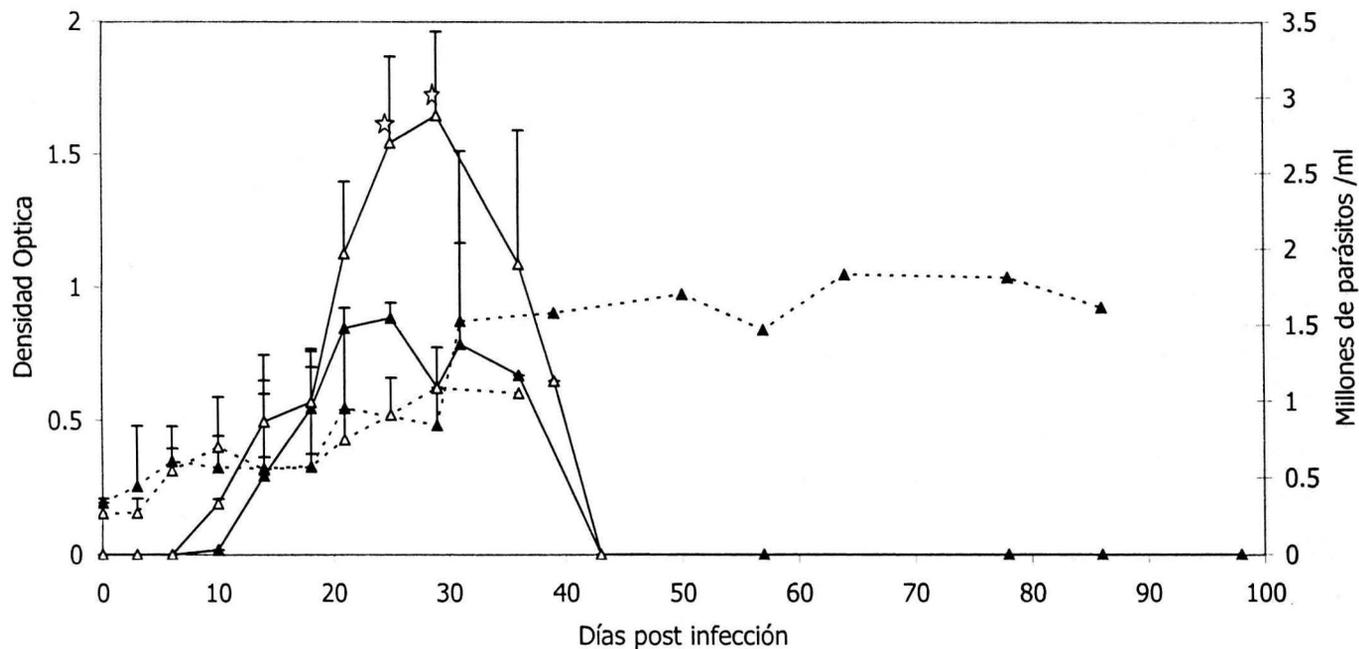


Figura 5. Presencia de anticuerpos y parasitemia de ratones infectados con dos aislados de diferente virulencia de *T. cruzi* con un inóculo de 10 mil parásitos. Se presenta la parasitemia en circulación de ratones infectados con aislado avirulento en (—▲—), y anticuerpos en suero de ratones infectados con el mismo aislado en (---▲---), también la parasitemia en sangre de ratones infectados con el aislado virulento (—△—) y anticuerpos anti-el mismo aislado (---△---). La sangre para medir la parasitemia fue tomada del plexo ocular cada tercer día y observada al microscopio óptico. Los anticuerpos IgG se determinaron por medio de la técnica de ELISA indirecto utilizando antígeno del parásito ya sea de la cepa virulenta o avirulenta. Las estrellas indican diferencias significativas en el número de parásitos en circulación entre las dos cepas utilizadas, esto se observó en los días 25 y 29 p.i.

V.4. SECRECIÓN DE CITOCINAS EN SUERO DE RATONES INFECTADOS CON *T. cruzi*.

La cinética de aparición de la citocina tipo Th1, IL-12 p40 se observa en el suero de ratones infectados con 100 mil parásitos de la cepa virulenta (figura 6). Esta mostró un incremento rápido en la primera y segunda semana de la infección, el mayor incremento fue de 1.2×10^3 pg/ml en el día 14 y después se observó un decremento. En cambio, en el grupo de ratones infectados con la cepa avirulenta hubo un incremento menor, ya que la concentración máxima fue de 0.495 pg/ml manteniéndose en los mismos niveles hasta el final de la infección en el día 93 p.i. Las diferencias en concentración observadas en los ratones infectados con la cepa virulenta fueron significativas respecto al grupo control y respecto al grupo de ratones infectados con la cepa avirulenta en los días 6 p.i. y 14 p.i. correspondiendo a la fase aguda de la infección.

Cuando se analizaron las concentraciones de la citocina IL-12 p40 en el suero de los ratones infectados con 10 mil parásitos (figura 7), se observó que esta citocina en los ratones infectados con la cepa virulenta tuvo una tendencia a aumentar hasta un máximo de 1.1×10^3 pg/ml en el día 18 p.i. y esos niveles bajaron casi a los niveles del grupo control en el día 25 p.i. Con los sueros de los ratones infectados con el mismo inóculo de la cepa avirulenta la concentración fue menor llegando a una concentración de 0.687×10^3 pg/ml en el día 25 p.i. conservándose similar hasta el día 93 p.i. Sin embargo, estas diferencias no fueron significativas.

El IFN- γ en suero de ratones infectados con 100 mil parásitos de la cepa virulenta se observó un incremento rápido durante la 1ª y 2ª semana con una concentración máxima durante la fase aguda de 28.6×10^3 pg/ml en el día 14 p.i. disminuyendo después rápidamente. En la figura 8, se observa que el comportamiento fue diferente en los ratones infectados con el mismo inóculo de la cepa avirulenta, en este caso, las concentraciones fueron menores presentándose máximos de 11.8×10^3 pg/ml, estos niveles se presentaron en el mismo día de máxima concentración observada en la cepa virulenta y estas diferencias fueron significativas. Así mismo, en la figura 9, se observa la concentración de la citocina INF- γ en el suero de los ratones infectados con 10 mil parásitos de la cepa virulenta que tuvo un comportamiento similar al

observado en el suero de los ratones infectados con 100 mil parásitos, por otro lado en el caso de los sueros de los ratones infectados con la cepa avirulenta presentó dos picos, uno de 9.2×10^3 en el día 10 p.i. y otro mayor en el día 18 p.i. de 15.8×10^3 y disminuyendo después hasta niveles muy cercanos al control, observándose diferencias significativas sólo en el día 10 p.i.

En cuanto a las citocinas tipo Th2, en la figura 10 se muestran la cinética de aparición de la citosina IL-10 donde se observó un comportamiento diferente ya que, en los sueros de ratones infectados con 100 mil parásitos de la cepa virulenta se observó una disminución significativa de 0.426×10^3 pg/ml (control) hasta niveles de 0.058×10^3 pg/ml (infectado) en el día 14 p.i. En cambio, en el suero de los ratones infectados con 100 mil parásitos de la cepa avirulenta, esta citocina presentó tendencia similar al comportamiento de los ratones infectados con la cepa virulenta con valores de 0.426×10^3 pg/ml (control) mostrando una bajada significativa de 0.124×10^3 pg/ml (infectado) en el día 25 p.i. Como se puede observar en la figura 11, el comportamiento de esta citocina en el suero de los ratones infectados con 10 mil parásitos de la cepa virulenta tuvo comportamiento similar ya que, presentó un pico en el día 6 de 0.630×10^3 y después una disminución rápida, este mismo comportamiento también se presentó en los sueros de ratones infectados con la cepa avirulenta en el mismo día con valores similares, no observándose diferencias significativas entre ambas cepas.

En la figura 12 se observa otra de las citocinas tipo Th2 que se analizó, la citocina IL-4 en suero de ratones infectados con 100 mil parásitos de la cepa virulenta, encontrándose un pico de 2.1×10^3 pg/ml en el día 21 p.i. (Apéndice 14). Por otro lado, los sueros de los ratones infectados con la cepa avirulenta mostraron tendencia a incrementarse alcanzando un máximo de 1.5×10^3 en el día 43 p.i. y se mantuvo en niveles cercanos. En los sueros de los ratones infectados con la cepa virulenta presentó incremento significativo en el día 21 respecto al suero de ratones infectados con la cepa avirulenta. Por otro lado, en la figura 13 se observó que el inóculo con 10 mil parásitos también produjo una tendencia de incremento de la citocina, presentando un pico máximo de 1.6×10^3 pg/ml pero hasta el día 36 p.i. En los ratones infectados con la cepa

avirulenta la tendencia fue similar incrementándose la concentración conforme pasaba la infección hasta alcanzar niveles máximos de 2.9×10^3 pg/ml en el día 29 p.i. y manteniéndose todavía al inicio de la fase crónica en niveles de 2.3×10^3 a 2.7×10^3 pg/ml. (Apéndice 14). No observándose diferencias significativas en los niveles de esta citocina en los ratones infectados con ambas cepas.

IL-12 p40	Cepa y Carga	Experimento 1		Experimento 2		Concentración Promedio pg/ml	Desviación estándar
		Día	Concentración pg/ml	Concentración pg/ml	Concentración pg/ml		
Avirulenta 100mil	0	51		92	120	88	35
	6	275	253	233	208	242	28
	14	622	506	486	366	495	104
	18	403	409	455	370	409	34
	25			589	370	479	n.c.
	78			500	424	462	n.c.
	93	450	347	500	419	429	64
Virulenta 100mil	0	51		92	120	88	35
	6	753	727	433	468	545	168
	14	1624	1744	814	718	1225	533
	18	1068	1183			1125	n.c.
	21	1039	854	714	558	795	204
	29			1100	953	1026	n.c.

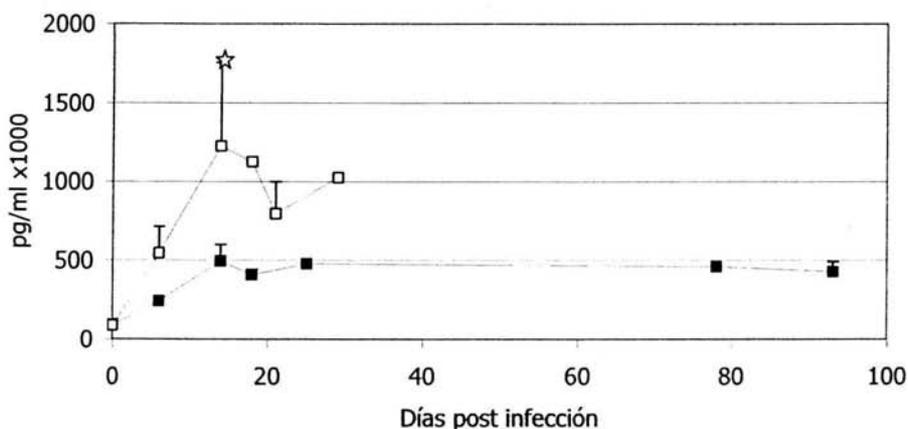


Figura 6. Tabla de datos y concentración de la citocina IL-12 p40 en suero de ratones infectados con 100 mil parásitos de las cepas virulenta (□) y avirulenta (■). El suero de los ratones infectados se obtuvo por punción del plexo ocular cada tercer día y la citocina se detectó por medio de la técnica de ELISA sándwich utilizando un anticuerpo unido a biotina (ENDOGEN. Cambridge). Se utilizaron pools de 3 a 6 sueros de ratón. El suero de los ratones controles se graficó como día 0 p.i. La estrella indica diferencias significativas entre ambas cepas ($P < 0.05$).

IL-12 p40	Cepa y Carga	Experimento 1		Experimento 2		Concentración Promedio pg/ml	Desviación estándar
		Día	Concentración pg/ml	Concentración pg/ml	Concentración pg/ml		
Avirulenta 10 mil	0	51		92	120	88	35
	6	577	435	304	254	392	144
	10	555	478	392	375	450	83
	14	523	562			542	n.c.
	25			732	642	687	n.c.
	n.c.	50			633	526	579
n.c.	93	934	953	531	401	704	280
	Virulenta 10 mil	0	51		92	120	88
Virulenta 10 mil	6	1192	1110	540	544	846	353
	10	1126	1053	642	642	865	260
	18	1326	1037			1180	n.c.
	25	1105	1098	544	571	829	314
	29			325	320	322	n.c.

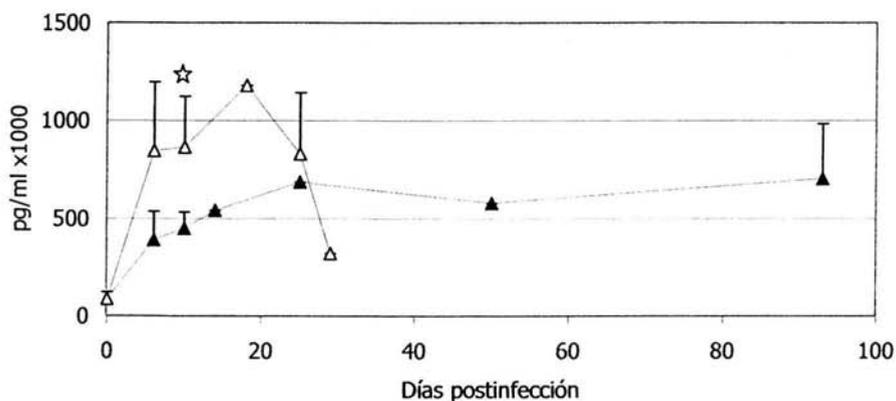


Figura 7. Tabla de datos y concentración de la citocina IL-12 p40 en suero de ratones infectados con 10 mil parásitos de cepas virulenta (△) y avirulenta (▲). El suero de los ratones infectados se obtuvo por punción del plexo ocular cada tercer día y la citocina se detectó por medio de la técnica de ELISA sándwich utilizando un anticuerpo unido a biotina (ENDOGEN. Cambridge). Se utilizaron pools de 3 a 6 sueros de ratón. El suero de los ratones controles se graficó como día 0 p.i. La estrella indica diferencias significativas entre ambas cepas.

Cepa y Carga	Día	Experimento 1		Experimento 2			Desviación estandar
		Concentración pg/ml	Concentración pg/ml	Concentración pg/ml	Concentración pg/ml	Concentración Promedio pg/ml	
Avirulenta 100 mil	0	666	222	74		320	308
	3	740	925			832	n.c.
	6	4625	4440			4532	n.c.
	10	7590	7755	8060	7413	7704	275
	14	13201	12046	11269	10846	11840	1034
	18	12442	12145			12293	n.c.
	21			843	969	906	n.c.
	25	3626	2442	1053	863	1996	1121
	36			678			n.c.
	53			444	518	481	n.c.
93	1332	1258	518	222	832	548	
Virulenta 100 mil	0	666	222	74		320	308
	3	962	2242			1602	n.c.
	6	13630	14884	3829	3954	9074	6000
	14	31985	27097	28148	27195	28606	2301
	18	12706	12607	6939	6120	9593	3553
	25	4972	4287	1896	1264	3104	1801
	29			1110	801	955	n.c.
36			801	1233	1017	n.c.	

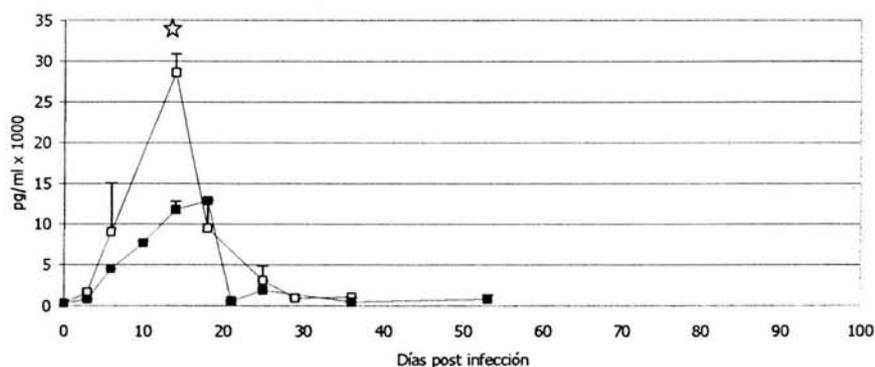


Figura 8. Tabla de datos y concentración de la citocina IFN- γ en suero de ratones infectados con 100 mil parásitos de cepas virulenta (□) y avirulenta (■). El suero de los ratones infectados se obtuvo por punción del plexo ocular cada tercer día y la citocina se detectó por medio de la técnica de ELISA sándwich utilizando un anticuerpo unido a biotina (ENDOGEN, Cambridge). Se utilizaron pools de 3 a 6 sueros de ratón. El suero de los ratones control se graficó como día 0 p.i. La estrella indica diferencias significativas entre la cepa virulenta y la cepa avirulenta $P < 0.05$. las siglas n.c. indican que no se calculó la desviación estándar.

Cepa y Carga	Dia	Experimento 1		Experimento 2			Desviación estandar
		Concentración pg/ml	Concentración pg/ml	Concentración pg/ml	Concentración pg/ml	Concentración Promedio pg/ml	
Avirulenta 10 mil	0	666	222	74		320	308
	3	1332	888			1100	n.c.
	6	1110	925	801	592	857	217
	10	9603	9405	8750	9310	9267	365
	14	8151	9636			8893	n.c.
	18	12310	19372			15841	n.c.
	25	10990	10825	3829	3954	7399	4000
	50			616	740	678	n.c.
	93	2782	2098	863	801	1636	969
Virulenta 10 mil	0	666	222	74		320	308
	3	1724	740			1232	n.c.
	6	555		678	444	559	n.c.
	10	22118	19002	20529	20000	20412	1301
	14	8667	8302	3161	2613	5685	3242
	18	3010	2645			2827	n.c.
	25	1776	1554	1517	1348	1548	176
	29			1053	1391	1222	n.c.
	50	1110	740			925	n.c.

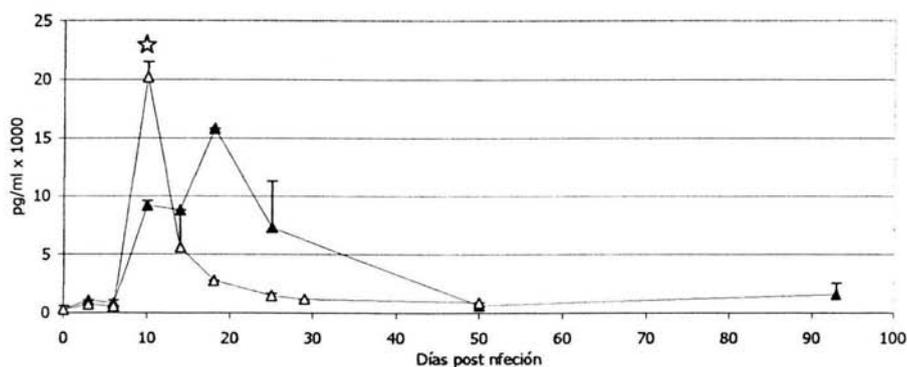


Figura 9. Tabla de datos y concentración de la citocina IFN- γ en suero de ratones infectados con 10 mil parásitos de cepas virulenta (\triangle) y avirulenta (\blacktriangle). El suero de los ratones infectados se obtuvo por punción del plexo ocular cada tercer día y la citocina se detectó por medio de la técnica de ELISA sándwich utilizando un anticuerpo unido a biotina (ENDOGEN. Cambridge). Se utilizaron pools de 3 a 6 sueros de ratón. El suero de los ratones control se graficó como día 0 p.i. La estrella indica diferencias significativas entre la cepa virulenta y cepa avirulenta $P < 0.0$. Las siglas n.c. indican que no se cálculo la desviación estándar.

Cepa y Carga	Dia	Experimento 1		Experimento 2		Concentración Promedio pg/ml	Desviación estandar
		Concentración pg/ml	Concentración pg/ml	Concentración pg/ml	Concentración pg/ml		
Avirulenta 100 mil	0	688	575	168	274	426	245
	3	320	271	196	179	241	65
	6	259	172	218	39	172	95
	14	234	160	280	106	195	77
	21	123	160	190	134	151	29
	25	160	160	106	72	+ 124	43
	78	98					n.c.
Virulenta 100 mil	0	688	575	168	274	426	245
	3	123	98	196	213	157	55
	14	86	37	44	67	+ 58	22
	18	197	296	50	60	150	150
	21	111	160	123	151	136	23
	29	616	123	207	190	284	224

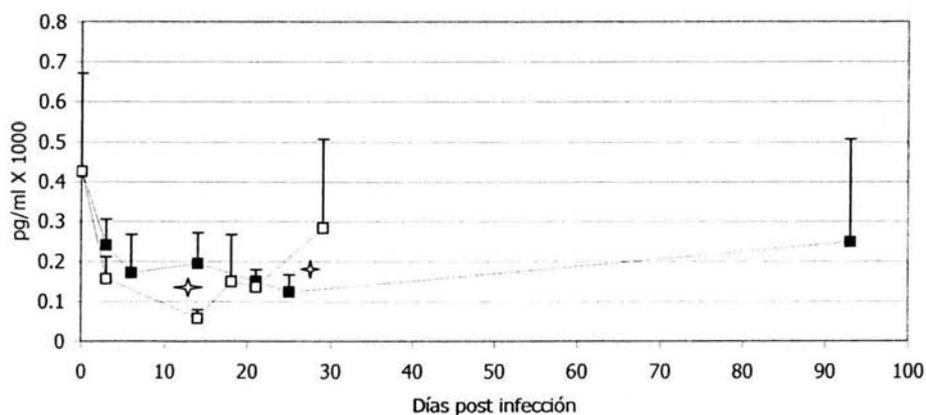


Figura 10. Tabla de datos y concentración de la citocina IL-10 en suero de ratones infectados con 100 mil parásitos de cepas virulenta (□) y avirulenta (■). El suero de los ratones infectados se obtuvo por punción del plexo ocular cada tercer día y la citosina se detectó por medio de la técnica de ELISA sándwich utilizando un anticuerpo unido a biotina (ENDOGEN. Cambridge). Se utilizaron pools de 3 a 6 sueros de ratón. El suero de los ratones control se graficó como día 0 p.i. La estrella indica diferencias significativas entre la cepa virulenta y cepa avirulenta $P < 0.0$. Las siglas n.c. indican que no se calculó la desviación estándar. El punto (+) indica disminuciones significativas en ambas cepas.

		Experimento 1		Experimento 2			
Cepa y Carga	DIA	Concentración pg/ml	Concentración pg/ml	Concentración pg/ml	Concentración pg/ml	Concentración Promedio pg/ml	Desviación estándar
Avirulenta 10 mil	0	688	575	168	274	426	245
	6	431	604	173	1273	620	469
	10	530	530	183	84	331	232
	14	1110	1110	33	11	566	628
	21	160	160	100	5.6	106	72
	25	37	24	128	5.6	48	54
	93	596	483	134	5.6	306	28
Virulenta 10 mil	0	688	575	168	274	426	245
	6	1264	883	162	213	630	535
	10	271	283	106	89	187	103
	18	209	234	72	95	152	80
	25	86	160	134	151	132	32
	29	1058	1027	218	123	606	505

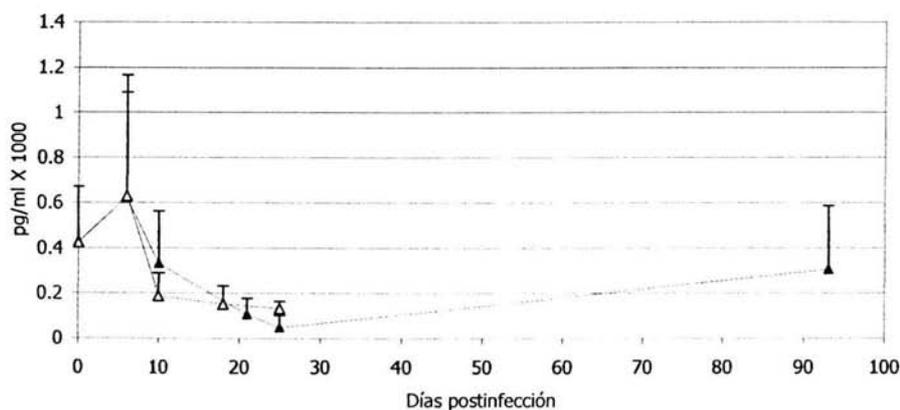


Figura 11. Tabla de datos y concentración de la citocina IL-10 en suero de ratones infectados con 10 mil parásitos de cepas virulenta (___▲___) y avirulenta (___△___). El suero de los ratones infectados se obtuvo por punción del plexo ocular cada tercer día y la citocina se detectó por medio de técnica de ELISA sándwich (ENDOGEN Cambridge) se midió la concentración de cada citosina. Se utilizaron pools de 3 a 6 sueros de ratón. El suero de los ratones control se graficó como día 0 p.i.

		Experimento 1		Experimento 2			
Cepa y Carga	DIA	Concentración pg/ml	Concentración pg/ml	Concentración pg/ml	Concentración pg/ml	Concentración Promedio pg/ml	Desviación estándar
Avirulenta 100 mil	0	568	618	217	242	411	211
	3	791	651			721	n.c.
	6			526	612	569	n.c.
	10	609	609			609	n.c.
	14	906	1137	884	994	994	114
	18	832	1071			951	n.c.
	21	980	1046	1135	1217	1090	103
	25	675	733			704	n.c.
	29			915	839	877	n.c.
	36			963	1069	1014	n.c.
	43			1623	1565	1568	n.c.
	53	1211	1607			1417	n.c.
	78	947	1129			1036	n.c.
	86	1063	1681			1344	n.c.
93	1046	1046	1541	2236	1433	563	
Virulenta 100 mil	0	568	618	217	242	411	211
	3	206	215	447	423	322	133
	6	576	807	84	74	385	366
	10	1500	1590	246	346	922	723
	14			1154	1338	1233	n.c.
	18			2410	1709	2053	n.c.
	21	1739	1788	2512	2521	☆ 2135	435
	25	807	914	1599	1751	1235	476
	29	1244	1104	1506	1627	1328	238

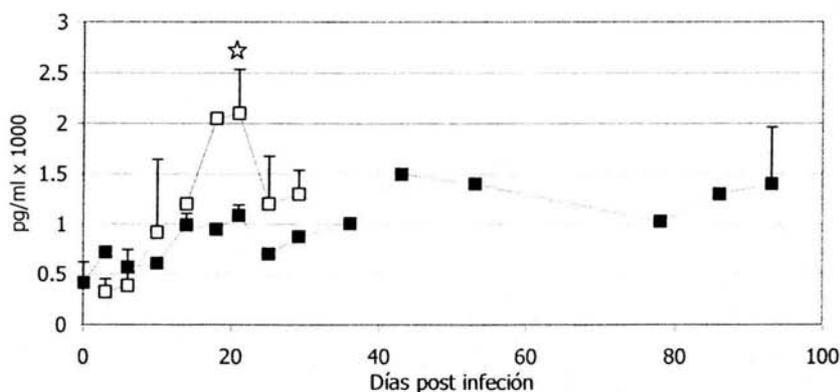


Figura 12. Tabla de datos y concentración de la citocina IL-4 en suero de ratones infectados con 100 mil parásitos de cepas virulenta (□) y avirulenta (■). El suero de los ratones infectados se obtuvo por punción del plexo ocular cada tercer día y la citocina se detectó por medio de la técnica de ELISA sándwich utilizando un anticuerpo unido a biotina (ENDOGEN, Cambridge). Se utilizaron pools de 3 a 6 sueros de ratón. El suero de los ratones control se graficó como día 0 p.i. La estrella indica diferencias significativas entre la cepa virulenta y la cepa avirulenta $P < 0.05$. Las siglas n.c. indican que no se calculó la desviación estándar.

Cepa y Carga	DÍA	Experimento 1		Experimento 2		Concentración Promedio pg/ml	Desv. estand
		Concentración pg/ml	Concentración pg/ml	Concentración pg/ml	Concentración pg/ml		
Avirulenta 10 mil	0	568	618	217	242	411	211
	6	947	1096	158	272	618	472
	10	568	692			633	0
	14	956	923	763	1100	935	138
	18	840	1203			1023	0
	21	1681	1656	485	760	1100	614
	25	2085	2423			2224	0
	29	4659	4563	1389	1385	2935	1832
	36	2942	2595	1875	1878	2326	534
	43	1178	1920	2875	3181	2281	934
	57	2242	2553			2335	0
	71	2266	2500			2333	0
	78	1912	3552			2723	0
	86	2715	2488			2622	0
93	2757	2811	1448	1358	2092	798	
Virulenta 10 mil	0	568	618	217	242	411	211
	3	187	159	478	560	346	202
	6	93		381	371	371	163
	10	956	1228			1092	0
	14	989	1376	729	712	951	312
	18	923	906	963	1276	1012	174
	21	774	807	698	897	794	82
	25	1021	1483	1716	2019	1525	422
	39	1590	1359	1950	1754	1623	252

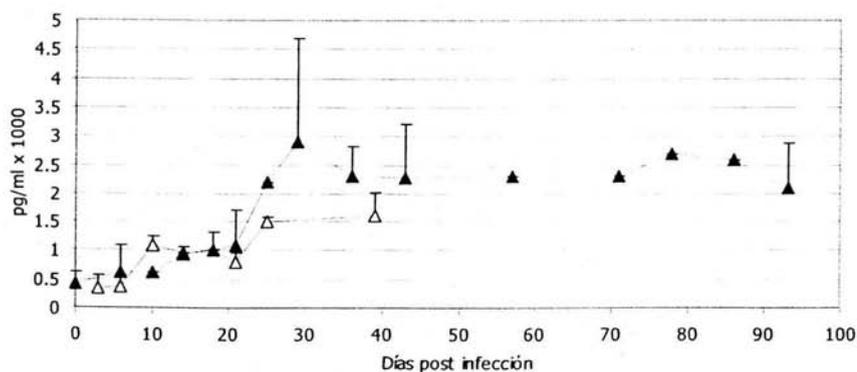


Figura 13. Tabla de datos y concentración de la citocina IL-4 en suero de ratones infectados con 10 mil parásitos de cepas virulenta (\triangle) y avirulenta (\blacktriangle). El suero de los ratones infectados se obtuvo por punción del plexo ocular cada tercer día y la citocina se detectó por medio de técnica de ELISA sándwich (ENDOGEN, Cambridge) se midió la concentración de cada citocina. Se utilizaron pools de 3 a 6 sueros de ratón. El suero de los ratones control se graficó como día 0 p.i. Las siglas n.c. indican que no se cálculo la desviación estándar.

V.5. SECRECIÓN DE CITOCINAS EN SOBRENADANTE DE CÉLULAS DE BAZO DE RATONES INFECTADOS CON CEPA AVIRULENTE Y CEPA VIRULENTE DE *Trypanosoma cruzi*.

Para la cuantificación de citocinas en el sobrenadante de células de bazo de los ratones infectados con ambas cepas, en todos los experimentos se sacrificaron por lo menos de 3 a 4 ratones por grupo experimental (para esta serie de experimentos sólo se utilizó el inóculo de 100 mil parásitos de ambas cepas), como grupo control se utilizaron ratones no infectados, obteniéndose las células de bazo como se mencionó en la sección de material y métodos. Las citocinas analizadas fueron de ambos tipos Th1 y Th2, y fueron las mismas que se estudiaron en los sueros de los ratones infectados. Como se muestra en la figura 14, los sobrenadantes de células de bazo de los ratones infectados con la cepa virulenta durante la fase aguda mostraron que la citocina IL-12 p40 presentó valores de 14 pg/ml que fue muy similar a las concentraciones encontradas en el grupo control (24 pg/ml) y en el grupo infectado con la cepa avirulenta (20 pg/ml) no observándose diferencias significativas entre ambas cepas y las células de bazo del grupo control (Apéndice 15). La concentración de esta citocina en los sobrenadantes de células de ratones infectados con la cepa avirulenta se mantuvo igual durante la fase crónica.

En la figura 15 se puede observar que la citocina IFN- γ en el sobrenadante de células de bazo de ratones infectados con la cepa virulenta durante fase aguda presentó una concentración de 499 pg/ml, en cambio, en el sobrenadante de las células de bazo de ratones infectados con la cepa avirulenta sólo se detectaron 156 pg/ml, estas diferencias fueron significativas entre ellas y con las células de bazo del grupo control (Apéndice 15). Durante la fase crónica de la infección, los sobrenadantes de las células de bazo de los ratones infectados con la cepa avirulenta mostraron los niveles similares en la fase aguda de la infección.

Por otro lado, respecto a las citocinas tipo Th2, la citocina IL-10 en sobrenadante de células de bazo de ratones infectados con la cepa virulenta durante la fase aguda presentó 439 pg/ml (figura 16) y no presentó diferencias significativas con el sobrenadante del grupo control y el

sobrenadante del grupo infectado con la cepa avirulenta. Durante la fase crónica los sobrenadantes de las células de bazo de ratones infectados con la cepa avirulenta presentaron un incremento de 319 pg/ml que tampoco fue significativo respecto al grupo control y el grupo infectado con la cepa virulenta (Apéndice 16).

En figura 17 se puede observar otra de las citocinas analizadas, la IL-4, en donde los sobrenadantes de células de bazo de ratones infectados con la cepa avirulenta durante la fase aguda, presentó diferencias significativas respecto a el grupo control (11 pg/ml), y disminuyó durante la fase crónica. En cambio, en el sobrenadante de células de bazo de ratones infectados con la cepa virulenta presentó un incremento de similar al control. En la fase crónica se encontraron valores de 18 pg/ml similares al grupo control (Apéndice 16).

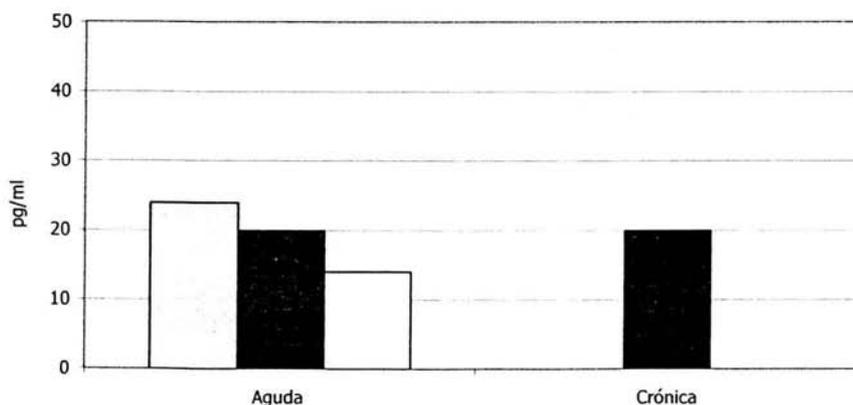


Figura 14. Concentración de IL-12 p40 en el sobrenadante de células de bazo de ratones infectados con 100 mil parásitos. Se representa los sobrenadantes de los ratones infectados con la cepa virulenta en blanco, con la cepa avirulenta en negro y el control no infectado en gris. Este experimento se llevó a cabo sólo en fase aguda (en el día 15 p.i.) para el grupo de ratones infectados con la cepa virulenta y durante la fase aguda (día 21 p.i.) y crónica (en día 98 p.i.) para el grupo de ratones infectados con la cepa avirulenta. Se disgregaron los bazos del grupo control e infectados, se obtuvieron las células, se incubaron 200 000 células por 48 horas aproximadamente, se obtuvo el sobrenadante y se midió la concentración de la citosina por la técnica de ELISA sándwich (ENDOGEN Cambridge) analizando pools de 3 a 6 sueros de ratones.

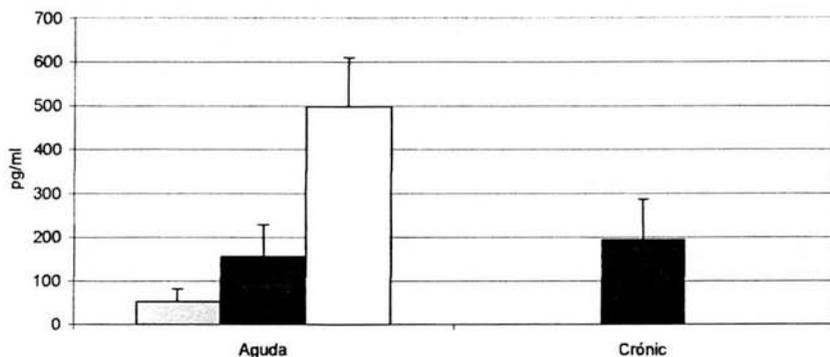


Figura 15. Concentración de IFN- γ en el sobrenadante de células de bazo de ratones infectados con 100 mil parásitos. Se representa los sobrenadantes de los ratones infectados con la cepa virulenta en blanco, con la cepa avirulenta en negro y el control no infectado en gris. Este experimento se llevó a cabo sólo en fase aguda (día 15 p.i.) para el grupo de ratones infectados con la cepa virulenta y durante la fase aguda (día 21 p.i.) y crónica (día 98 p.i.) para el grupo de ratones infectados con la cepa avirulenta. Se disgregaron los bazos del grupo control e infectados, se obtuvieron las células, se incubaron 200 000 células por 48 hrs. aproximadamente, se obtuvo el sobrenadante y se midió la concentración de la citocina por la técnica de ELISA (ENDOGEN Cambridge) analizando pools de 3 a 6 sueros de ratones. La estrella indica diferencias significativas entre el sobrenadante de células de bazo de ratones infectados con la cepa virulenta y grupos control e infectados con cepa avirulenta.

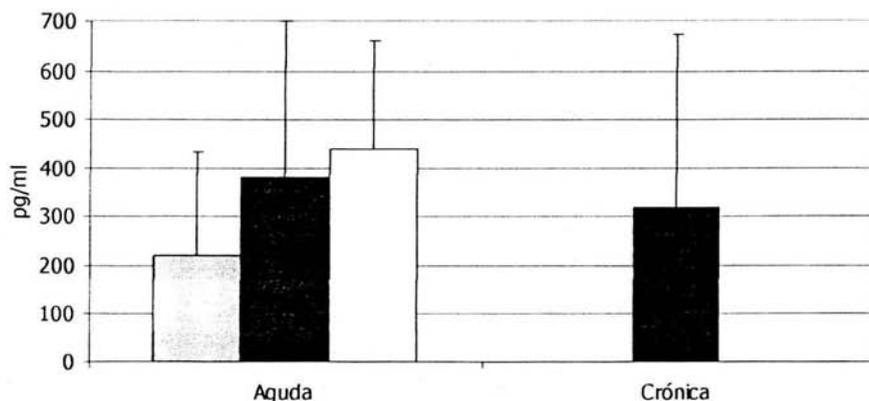


Figura 16. Concentración de IL-10 en el sobrenadante de células de bazo de ratones infectados con 100 mil parásitos. Se representa los sobrenadantes de los ratones infectados con la cepa virulenta en blanco, con la cepa avirulenta en negro y el control no infectado en gris. Este experimento se llevó a cabo sólo en fase aguda (día 15 p.i.) para el grupo de ratones infectados con la cepa virulenta y durante la fase aguda (día 21 p.i.) y crónica (día 98 p.i.) para el grupo de ratones infectados con la cepa avirulenta. Se disgregaron los bazos del grupo control e infectados, se obtuvieron las células, se incubaron 200 000 células por 48 hrs. aproximadamente, se obtuvo el sobrenadante y se midió la concentración de la citocina por la técnica de ELISA (ENDOGEN Cambridge) utilizando pools de 3 a 6 sueros de ratones.

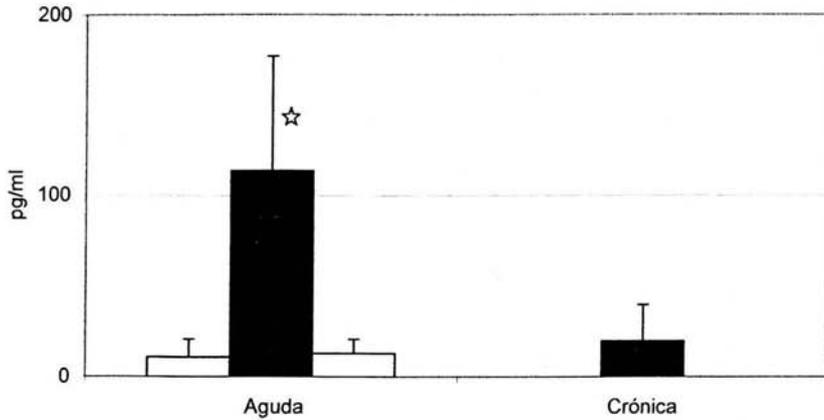


Figura 17. Concentración de IL-4 en el sobrenadante de células de bazo de ratones infectados con 100 mil parásitos. Se representa los sobrenadantes de ratones infectados con la cepa virulenta en blanco, con la cepa avirulenta en negro y el control no infectado en gris. Este experimento se llevó a cabo sólo en la fase aguda (día 15 p.i.) para el grupo de ratones infectados con la cepa virulenta y durante fase aguda (día 21 p.i.) y crónica (día 98 p.i.) para el grupo de ratones infectados con la cepa avirulenta. Se disgregaron los bazos del grupo control e infectados, se obtuvieron las células, se incubaron 200 000 células por 48 hrs. aproximadamente, se obtuvo el sobrenadante y se midió la concentración de la citocina por la técnica de ELISA (ENDOGEN Cambridge) utilizando pools de 3 a 6 de sueros de ratones. La estrella indica diferencias significativas entre ambas cepas.

VI. DISCUSION.

VI.1. VIRULENCIA.

Dentro de los mecanismos involucrados en la respuesta inmune contra *T. cruzi* es importante mencionar que la base genética del hospedero es determinante para el desenlace de esta infección. Recientes estudios sobre infección experimental en modelo murino indican una influencia de la variabilidad genética del ratón en la resistencia o susceptibilidad a la infección con *T. cruzi*. Sin embargo no hay un locus firmemente identificado, loci del complejo de histocompatibilidad (Tarleton y cols, 1996) y niveles de citocinas (Bahia-Oliveira y cols, 1998; Powell y cols 1998; Umekita y Mota, I. 2000) han sido implicados en la modulación de la infección con *T. cruzi*.

También es cierto que el tropismo por el tejido es afectado por las interacciones entre macromoléculas sobre la superficie de ambos parásito y célula hospedera (Macedo, y cols, 2002. <http://www-ermm.cbcu.cam.ac.uk>). Además, es importante mencionar que los mecanismos de respuesta inmune contra la cepa de parásito están influenciados por la alta variabilidad genética entre las diferentes cepas de *T. cruzi*, de ahí que algunas cepas resulten ser más virulentas que otras. En este trabajo se vio que mientras se infectaba a un grupo de ratones con dos cepa mexicanas utilizando dos inóculos 100 mil y 10 mil parásitos una de ellas resultó ser muy virulenta y la otra totalmente avirulenta lo que le permitió a los ratones sobrevivir hasta la fase crónica de la infección.

En este estudio se trató a ratones genéticamente susceptibles a la infección (BALB/C), encontrándose cambios en la apariencia física del ratón. En los ratones infectados con la cepa virulenta se notó erizamiento de pelaje, y dificultad para el movimiento de los cuartos traseros durante todo el curso de la infección, tanto en el caso de los grupos de ratones infectados con 100 mil y 10 mil parásitos, en cambio en los ratones infectados con la cepa avirulenta estos padecimientos fueron mucho menos evidentes. Algunos autores han mencionan que la virulencia de las diferentes cepas está asociado con la rapidez de interacción entre el parásito y el huésped,

por la entrada a la célula y la rapidez de multiplicación una vez dentro de ésta, que resulta ser diferente para una cepa virulenta en un 100% que para otra cepa que no causa la muerte a pesar de que los ratones alcanzaron la fase crónica de la infección (Andersson. y cols., 2003). Las cepas utilizadas en este estudio son mexicanas y pertenecen al genotipo 1, (Espinoza y cols., 1998; López-Olmos y cols., 1998) y probablemente presentan diferencias en la infección que les hace presentar diferentes grados de virulencia.

VI.2. PARASITEMIA.

Como ya se ha reportado cuando una cepa resulta ser virulenta al 100% para un grupo de ratones intervienen varios factores entre ellos la cantidad de parásitos inoculada, el fondo genético del huésped en este caso la cepa de ratón BALB/c que se ha reportado como susceptible a la infección, es decir, el grado de virulencia lo determina también el huésped (Roggero y cols., 2002). En este trabajo se encontró que a pesar del fondo genético del ratón que fue el mismo, se encontró una importante variación en cuanto a la parasitemia encontrada en ratones infectados con una cepa avirulenta y otra virulenta utilizando un mismo inóculo.

Analizando la influencia del tamaño del inóculo, cuando se utilizó una cepa se observó una diferencia en cuanto a número de parásitos en el grupo de ratones infectados con 100 mil parásitos ya que tuvo un pico máximo de 4.07 millones de parásitos (Tabla 1), en cambio, el grupo de ratones infectados con 10 mil parásitos llegó sólo a 2.9 millones de parásitos por mililitro, muy similares en el día de aparición, en cuanto al día que desaparecen los parásitos se desplaza en el grupo de ratones infectados con 10 mil al día 45 p.i., en caso del grupo infectado con 100 mil fue el día 42 p.i. La diferencia entre el grupo de ratones infectados con 100 mil y 10 mil parásitos es de 1.2 millones de parásitos por mililitro no observándose diferencias significativas entre utilizar un inóculo alto y una bajo de la misma cepa virulenta. En el grupo de ratones infectados con la cepa avirulenta con 100 mil parásitos podemos ver, en promedio de tres experimentos, la aparición de parásitos en el día 5 p.i. (post infección) y su pico máximo de parásitos en el día 26 ± 3.7 p.i. con 1.38 millones de parásitos por mililitro y el día 44 ± 3.7 p.i.

desaparecieron de circulación. Como podemos ver la capacidad de infección en la cepa virulenta con 100 mil parásitos es mayor tres veces que los ratones infectados con la cepa avirulenta con la misma cantidad inicial de parásitos observándose diferencias significativas entre ambas cepas utilizando un mismo inóculo. En el caso del grupo de ratones infectados con 10 mil parásitos la cepa virulenta es nuevamente mayor poco más del doble en comparación con el grupo de ratones infectados con la cepa avirulenta (Figura 4 y Apéndice 5 y 6). Se observaron diferencias significativas en cuanto a número de parásitos entre los ratones infectados con la cepa virulenta y avirulenta con el inóculo de 10 mil parásitos.

Por otro lado, se observó que la cantidad de parásito inoculado no presentó diferencias significativas. En el caso de los ratones infectados con 10 mil parásitos tuvo un comportamiento similar, ya que los parásitos aparecieron el día 7 p.i. y su pico máximo el día 28 ± 2.8 p.i. con 1.16 millones de parásitos entre estos grupos hay una variación de 216,333 parásitos por mililitro, como podemos ver existe cierto comportamiento similar pero la variaciones en el número de parásitos inoculado, y el pico máximo, aunque el día de desaparición fue el mismo. (Tabla 1 y Apéndice 7 y 8).

La máxima parasitemia se encontró en torrente sanguíneo de los ratones infectados con la cepa virulenta y fue mayor significativamente respecto a la parasitemia encontrada en los ratones infectados con la cepa avirulenta, lo cual indica que la alta capacidad infectante que presentan los parásitos de la cepa virulenta debe ser mayor en esta cepa, esto concuerda con los resultados obtenidos en laboratorio en los cuales, en líneas celulares la cepa virulenta (mexicana) invade con una rapidez impresionante todas las células que se encuentren, en cambio, con la cepa avirulenta, también mexicana, la capacidad de infectar es mucho menor y también concuerda con estudios en los que se determinó que las cepas mexicanas de *T. cruzi* virulentas tienen mayor capacidad de infectar células y tejidos blanco (Salazar-Schettino et al 1984).

VI.3. ANTICUERPOS

Se cree que los anticuerpos son uno de los mecanismos de defensa durante infecciones parasitarias como la de *T. cruzi* pues tienen la capacidad de inducir la desaparición de tripomastigotes de sangre en ratones induciendo la diferenciación de células que se encuentran en torrente sanguíneo como los macrófagos, monolitos etc... Se ha mencionado también que son importantes durante la fase crónica, pues se ha visto que los animales que han llegado a esta fase, en caso de reinfección, no presentan una nueva fase aguda (Moretti y cols., 2002). Además se sugiere que los anticuerpos son de gran importancia para la respuesta inmune pues pueden alertar al organismo de que algo extraño está sucediendo y son capaces de mediar eventos celulares entre ellos la secreción de Oxido Nítrico, seguir con una estimulan las células del sistema inmune para la secreción de citocinas y quimiocinas entre otras acciones. Además, varios autores mencionan que los anticuerpos intervienen en la activación de diferenciación de células B y estas son importantes productoras de citocinas TH1 necesarias para el control de la replicación del parásito en circulación que concuerda con los resultados encontrados en este trabajo donde los niveles máximos de anticuerpos se presentaron cuando la parasitemia comienza a bajar controlando un poco la infección (Umekita y Mota, 2000). Se ha visto que cuando el número de parásitos en circulación se empieza a incrementar el nivel de anticuerpos se eleva pero, en nuestro caso del suero de ratones infectados con la cepa virulenta es tal la respuesta inmune ante tal cantidad de parásitos que los anticuerpos no son suficientes para el control de la infección, además no hubo diferencias en cuanto a anticuerpos entre una cepa y otra. Respecto a los diferentes inóculos analizados no hubo diferencias entre utilizar un inóculo u otro, pues la presencia de anticuerpos fue igual.

VI.4. SECRECIÓN DE CITOCINAS EN SUERO DE RATONES INFECTADOS.

Durante la cinética de secreción de citocinas observada en esta infección experimental con dos cepas mexicanas, podemos decir que presentó concentraciones importantes tanto Th1 como Th2.

De este modo se observó primero la presencia de la citocina IL-10 del tipo Th2, en el suero de ratones infectados con 100 mil parásitos de la cepa virulenta, de esta citocina se observaron dos picos importantes, el primero de ellos en el día 3 p.i. (etapa temprana de la infección), ante esta secreción nuestros resultados sugieren que debido a la enorme activación de células secretoras de INF- γ , y de acuerdo con algunos autores la IL-10 tiene un papel regulador de la respuesta inmune en ratones susceptibles, ya que se ha visto que esta citocina promueve la presencia del parásito resultando una elevación de la parasitemia (Gazzinelli, y cols., 1992; Abrahamsohn, y cols., 2000), por otro lado el sistema inmune del ratón se encuentra desorientado pues tiene que reaccionar rápidamente ante la elevada cantidad de parásitos en circulación y para esto se dio un disparo grande de INF- γ . Sin embargo en este trabajo no se observó secreción de IL-10, pues se dieron disminuciones significativas que posiblemente ayudaron sólo a los ratones infectados con la cepa avirulenta, pues con la cantidad de interferon que se estaba secretando fue suficiente para controlar la infección, y en cambio en los ratones infectados con la cepa virulenta con niveles altos de IL-4 y altos niveles de INF- γ llevaron a la muerte al ratón.

También la presencia de la citocina IL-12 con comportamiento similar con niveles altos y significativos en el suero de los ratones infectados con la cepa virulenta, en cambio en el suero de los ratones infectados con la cepa avirulenta se presentaron niveles moderados cercanos a los niveles del control, durante la primera y segunda semana de la infección, estas concentraciones encontradas durante la fase aguda de la infección coinciden cuando las concentraciones de INF- γ se, mantienen en concentraciones altas. La presencia elevada de la IL-12 sugiere una importante participación de células NK entre otras, que ayudan con la secreción de INF- γ que lejos de ayudar está perjudicando al hospedero y como lo mencionan algunos autores que una marcada producción de esta citocina trae como resultado un agravamiento de la enfermedad (Ribeirao y cols., 2000).

La citocina IL-4 en ratones infectados con 100 mil parásitos presenta un comportamiento durante el principio de la infección, y cuando empieza la fase crónica para el grupo de los ratones infectados con la cepa virulenta los valores tienden a subir, sucede lo mismo cuando se utiliza un inóculo menor nosotros pensamos que esta es una respuesta a tratar de controlar la elevada cantidad de IFN- γ , en cambio en los sueros de los ratones infectados con la cepa avirulenta con el inóculo mayor solo se da un pico durante la fase aguda y sucede lo mismo cuando se utiliza un inóculo menor pero se mantienen los niveles altos hasta el fin de la infección, como podemos ver este comportamiento sugerimos que a menor inóculo la respuesta inmune es mas eficiente aunque en los sueros de los ratones infectados con la cepa virulenta es un descontrol que nunca se llega a recuperar el hospedero (Ribeirao y cols., 2000; Talvani y cols., 2000).

VI.5. SECRECIÓN DE CITOCINAS EN SOBRENADANTE DE CELULAS DE BAZO.

Dentro de este órgano los resultados son relevantes, y tomando en cuenta que se trata de un órgano que lleva a cabo la primera línea de defensa durante la respuesta inmune, y que por tanto el comportamiento en bazo es diferente que lo que pasa en torrente sanguíneo, ya que se sabe que en torrente sanguíneo se mezclan linfocitos, entre otras células de defensa, provenientes de timo y ganglios linfáticos.

Dentro de la respuesta inmune podemos observar a la citocina IL-12p40 en caso de los sobrenadantes de células de bazo de ratones infectados con cepa virulenta se mantuvo altos con niveles del doble que en el sobrenadante de células de bazo de ratones infectados con la cepa avirulenta. En este trabajo se puede sugerir que debido a los niveles tan altos observados en suero de ratones infectados y sobrenadante de células de bazo de los ratones infectados con la cepa virulenta, además de los niveles tan bajos de la citocina reguladora de la respuesta inmune como es, IL-10, es la responsable de evitar la exacerbación de la enfermedad y finalmente la muerte del ratón, otra citocina reguladora la IL-4 también podemos sugerir que el nivel tan alto de IFN- γ suprime de alguna forma la respuesta Th2., también podemos pensar que la cepa induce susceptibilidad ante la infección modulando respuesta Th1. Por otro lado en el caso de la

cepa avirulenta este comportamiento puede ser por una eficiente regulación de ambas respuestas Th1 y Th2, en la cual no hay secreción de IL-10 pero está presente en niveles altos la IL-4 durante la fase aguda y concuerda con algunos autores que mencionan que un incremento en la IL-10 durante la fase aguda es asociado a protección contra la excesiva patología inducida por respuesta Th1 (Gomes y cols., 2003). En cambio, en el caso de los ratones infectados con la cepa virulenta hubo altos niveles de IFN- γ que llevaron a exacerbación de la enfermedad y además la presencia de la citocina IL-4 en niveles altos y significativos le indujeron al ratón mayor susceptibilidad a la infección. En este trabajo se pudieron ver diferentes mecanismos involucrados, la importante participación de la respuesta Th1 dentro de la cual la citocina IFN- γ se elevó a niveles altos en el sobrenadante en células de bazo de ratones infectados con la cepa virulenta con respecto a las células de bazo de los controles y con respecto las células de bazo del grupo de ratones infectados con la cepa avirulenta (Figura 17), este comportamiento observado en el grupo de ratones infectados con la cepa virulenta nosotros sugerimos que esta cepa a nivel de bazo induce inhibición de la respuesta Th2 ocasionando un descontrol del sistema inmune que lejos de hacer un disparo moderado de IFN- γ , que es de las citocinas más importantes que regulan la respuesta inmune contra el parásito, llega a exacerbar la enfermedad y como en este trabajo le ocasiona la muerte al ratón (Minoprio y cols., 1993; Tarleton y cols., 2000).

VII. CONCLUSIONES.

Durante la infección con *Trypanosoma cruzi* ocurren varios cambios en el hospedero que pueden modificar el curso de la infección, estos mecanismos de respuesta inmune entre ellos está la respuesta tipo TH1, la cual está representada por citocinas que se encargan del control y aniquilamiento del parásito, pero también existe la presencia de citocinas tipo TH2 que regulan o suprimen la presencia de citocinas tipo Th1. En este trabajo se pudo ver que intervienen varios mecanismos, dentro de los cuales los anticuerpos, las citocinas, entre otros tienen la actuación principal.

En este trabajo los anticuerpos que un aumento en niveles de anticuerpos estaba relacionado con la multiplicación del parásito, este comportamiento se repite con ambas cepas. Se pudo comprobar que la virulencia en una cepa de *T. cruzi* determina su comportamiento en cuanto a patrón de citocinas en las etapas posteriores de la infección.

Por otro lado podemos ver que en el sobrenadante de células de bazo de ratones infectados con la cepa avirulenta, los niveles de IL-4 se mantienen altos y esto puede llegar a hacer más eficiente la respuesta tipo Th2 regulando la respuesta Th1 evitando así su muerte, no pasa lo mismo en el caso del sobrenadante de las células de bazo de ratones infectados con la cepa virulenta que siempre mantuvieron sus niveles bajos cercanos al control evitando el control de citocinas como INF- γ .

En este trabajo no se pudo concluir nada respecto a la citocina IL-10 pues se observaron disminuciones significativas debajo del control, se cree que a falta de ésta en el suero y sobrenadantes de células de bazo se pierde el control de la respuesta inmune en esta infección con cepas mexicanas.

Se pudo comprobar que durante la respuesta inmune contra *T. cruzi* en cepas mexicanas hay un descontrol en cuanto a regulación de citocinas llevando a la muerte al ratón aún cuando se utilizó una cepa que pertenece al genotipo 1 y no pasó lo mismo con una cepa avirulenta en la cual se observó un control tanto de citocinas Th1 como Th2.

VIII BIBLIOGRAFIA.

- Abbas, A., Lichtman, A. y Pober, J. 2001. *Inmunología Celular y Molecular*. Interamericana. España. 552 pp.
- Abrahamsohn, I. A., Galvao, S.A. y Coffman.R.L. 2000. Effects of interleukin-4 deprivation and treatment on resistance to *Trypanosoma cruzi*. *Infect. immun.* 68:1975-1979.
- Acosta, A.M y Santos-Buch, C.A. 1985. Autoimmune myocarditis induced by *Trypanosoma cruzi*. *Circulation*, 71:1255-1261.
- Andersson, J., Örn, A y Sunnemark, D. 2003. Chronic murine Chagas disease: the impact of host and parasite genotypes. *Immunol. Lett.* 86: 207-212.
- Andrews, N.W., Abrams, C.K., Slatin, S.L y Griffiths, G. 1990. A *T. cruzi*-secreted protein immunologically related to the complement C9: evidence for membrane pore-forming activity at low pH. *Cell* 61:1277-87.
- Andrade, Z.A. 1999. Immunopathology of Chagas disease. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 94: 71-80.
- Antúnez, M. I y Cardoni, R.L. 2000. IL-12 and IFN- γ production, and NK cell activity, in acute and chronic experimental *Trypanosoma cruzi* infections. *Immunol. Lett.* 71:103-109.
- Báez-Saldaña, A., Díaz, G., Espinoza, B y Ortega, E. 1998. Biotin deficiency induces changes in subpopulation of spleen lymphocytes in mice. *Am. J. Clin. Nutr.* 67:431-7
- Bahia-Oliviera, L.M. 1998. IFN-gamma in human Chagas disease: protection or pathology? *Braz. J. Med. Biol. Res.* 31, 127-131
- Ben Younes-Chennoufi, A., Hontebeyrie-Joskowicz, M., Tricottet, V., Eisen, H., Reynes, M y Said, G. 1988. Persistence of *Trypanosoma cruzi* antigens in the inflammatory lesions of chronically infected mice. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 82: 77-83.
- Biron, C.A y Gazzinelli, R.T. 1995. Effects of interleukin- 12 on immune responses to microbial infections: A key mediator in regulating disease outcome. *Curr. Biol.* 7: 485-496.
- Bosseno, M.F., Bernabé, Ch., Magallón, G. E., Lozano, K.F., Ramsey, J., Espinoza, B y Frédérique, B.S. 2002. Predominance of *Trypanosoma cruzi* Lineage I in México. *J. Clin. Microbiol.* 40: 627-632.
- Brener, Z. 1980. Immunity to *Trypanosoma cruzi*. *Adv. Parasitol.* 18: 247-92.
- Brener, Z. y Krettli, A.U. 1990. *Immunology of Chagas disease*, In D.J. Wyler (ed.), Modern parasite biology. W.H. Freeman & Co., New York. p. 247-261.

- Briones, M.R.S., Souto, R.P., Stolf, B.S y Zingales, B. 1999. The evolution of two *Trypanosoma cruzi* subgroups inferred from rRNA Genes can be correlated with the interchange of American mammalian faunas in the Cenozoic and has implications to pathogenicity and host specificity. *Mol Biochem. Parasitol.* 104: 219-232.
- Bogitsh, B.J., Middleton, O.L y Ribeiro-Rodrigues, R. 1998. Effects of the anti-tubulin drug trifluralin on the proliferation and metacyclogenesis of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. *Parasitol. Res.* 85: 475-480.
- Burleigh, B.A., y Woolsey, M.A. 2002. Cell signaling and *Trypanosoma cruzi* invasion. *Cell. Microbiol.* 4: 701-711.
- Burleigh, B.A y Andrews, N. W. 1995. Mechanisms of *Trypanosoma cruzi* invasion of mammalian cells. *Annu. Rev. Microbiol.* 49:175-200.
- Buscaglia, C.A y Di Noia, J.M. 2003. *Trypanosoma cruzi* clonal diversity and epidemiology of Chagas disease. *Microbes. Infect.* 5: 419-427.
- Caballero, M.L. 1996. Estudio de la respuesta inmune humoral inducida por cuatro aislados mexicanos de *Trypanosoma cruzi* en modelo murino. Tesis Prof. Facultad de Ciencias, UNAM. 92 pp.
- Caler, E.V., Morty, R.E., Burleigh, B.A y Andrews, N.W. 2000. Dual role of signaling pathways leading to Ca (2+) and cyclic AMP elevation in host cell invasion by *Trypanosoma cruzi*. *Infect. Immun.* 68: 6602-6610.
- Capron, M., Capron, A., Abdel-Hafez, S.K., Bazin, H., Joseph, M y Phillips, S.M. 1983. Immunologic response of athymic rats to *Schistosoma mansoni* infection. II. Antibody-dependent mechanisms of resistance. *J. Immunol.* 131: 1475-80.
- Coligan, J.E., Kruisbeek, A.M., Margulies, D.H., Shevach, E.M y Strober, W. 2000. *Current. Protocols. Immunology.* John Wiley y Sons, Inc. Somerset New. Jersey. 920 pp.
- De Souza, W. 2002. From the cell biology to the development of new chemotherapeutic approaches against trypanosomatids: dreams and reality. *Kinetopl. Biol. y Dis.* 1: 3.
- Dusanic, G. D. 1991. *Trypanosoma cruzi* (*Schistotrypanum cruzi*) In: Parasitic Protozoa *Academic Press.* London. 1: 137-194.
- DosReis, G.A. 1997. Cell-mediated immunity in Experimental *Trypanosoma cruzi* Infection. *Parasitol. Today,* 3: 335-342.

- Dumonteil, E. 1999. Update on Chagas disease in México. *Salud Pública de México*. 41: 322-327.
- Dutra, W.O., Gollob, K. J., Pinto-Días, J.C., Gazzinelli G., Correa -Oliveira, R. Coffman R.L. y Carvalho-Parra J.F. 1997. Cytokine mRNA profiles and compartmentalization of IL-2, IL-4, IL-5, IL-10 and IFN- γ -producing cells. *J. Parasitol.* 82: 59-65.
- Engman, D. M. y Leon J. S. 2002. Pathogenesis of Chagas disease: role of autoimmunity. *Acta Tropica*. 81: 123-132.
- Espinoza, B., Vera-Cruz, J.M., González, H., Ortega, E y Hernández, R., 1998. Genotype and virulence correlation within Mexican stocks of *Trypanosoma cruzi* isolated from patients. *Acta. Tropica*. 70: 63-72.
- Ferreira, A.W. 2001. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Serological Diagnosis of Chagas Disease Employing a *Trypanosoma cruzi* Recombinant Antigen That Consist of Four Different Peptides. *J. Clin. Microbiol.* 4390-4395.
- Frederick, P. H. 1995. Th1 and Th2 cells en the cure and pathogenesis of infection diseases. *Curr. Op. infect. Dis.* 8: 151-155.
- Gazzinelli, R.T., Oswald, I.P., Hieny, S. James, S.L. y Sher, A. 1992. The microbicidal activity of interferon- gamma-treated macrophages against *Trypanosoma cruzi* involves an L-Arg- dependent, nitrogen oxide-mediated mechanism inhabitable by interleukin-10 and transforming growth factor. *European J. immunol.* 22: 2501-2506.
- Gomes, J.A.S., Bahia-Oliveira, L.M.G., Rocha, M.O.C., Martins-Filho, O.A., Gazzinelli, G y Correa-Oliveira, R. 2003. Evidence that development of severe cardiomyopathy in Human Chagas disease is Due to a Th1-specific Immune response. *Infec. Immun.* 1185-1193.
- Guzmán-Bracho, C. 2001. Epidemiology of Chagas disease in Mexico: an update. *TRENDS Parasitol.* 17: 372-376.
- Hall, B. F., Furtado, G.C y Joiner, K. A. 1991. Characterization of host cell-derived membrane proteins of the vacuole surrounding different intracellular forms of *Trypanosoma cruzi* in J774 cells. Evidence for phagocyte receptor sorting during the early stages of parasite entry. *J. Immunol.* 147: 4313-21.
- Hays, W.L. 1998. STATISTICS The Dryden press. New York. 1102 pp.

- Hunter, C.A., Ellis, N.L., Slifer, T., Kanaly, S., Grunig, G., Fort, M., Rennick, D. y Araujo, F.G. 1997. IL-10 is required to prevent immune hyperactivity during infection with *Trypanosoma cruzi*. *J. Immunol.* 158: 3311-3316
- Joiner, K., Sher, A., Gaither, T y Hammer, C. 1986. Evasion of Alternative complement pathway by metacyclic trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi*: Dependence on the developmental regulated synthesis of surface protein and N-linked carbohydrate. *J. Immunol.* 137:2961-7.
- Joseph, M., Auriault, C., Capron, A., Vorng, H. y Viens, P. 1983. A new function for platelet: IgE-dependent killing of Schistosomes. *Nature*, 303: 310-312.
- Kawakami, K., Koguchi, Y., Qureshi, M.H., Miyazato, A., Yara, S., Kingo, Y., Iwakura, Y., Takeda, K., Akira, S., Kurimoto, M y Saito, A. 2000. IL-18 Contributes to Host Resistance Against Infection with *Cryptococcus neoformans* in Mice Defective IL-12 Synthesis Through Induction of IFN- γ Production by NK Cells. *J. Immunol.* 165:941-947.
- Kirchhoff, L.V., 1993. Chagas disease. American trypanosomiasis. *Infect. Disease. Clinic. Nort. Am.* 7: 487-502.
- Kretli, A.U y Brener, Z. 1982. Resistance against *Trypanosoma cruzi* associate to anti-living trypomastigote antibodies. *J. Immunol.* 128: 2009-2012.
- Laranja, F.S., Dias, E., Nobregó, G y Marinda, A. 1956. Chagas disease-a clinical, epidemiologic and pathologic study. *Circulation* 14: 1035-1060.
- Leedale, G.F. y Vickerman, K. 2000. Phylum Euglenozoa. En Lee, J.J., G.F. Leedale y P.C. Bradbury. And Illustrated guide to the protozoa. Organisms traditionally referred to as protozoa, or newly discovered groups. Society of Protozoologists, Lawrence. 1432 pp.
- Ley, V., Robbins, E.S., Nussenzweig, V y Andrews, N.W. 1990. The exit of *Trypanosoma cruzi* from the phagosome is inhibited by raising the pH of acidic compartments. *J. Exp. Med.* 171:401-13.
- López-Olmos V., Pérez-Nasser, N., Piñero, D., Ortega, E., Hernández, R y Espinoza, B. 1998. Biological characterization and genetic diversity of Mexican isolates of *Trypanosoma cruzi*. *Acta Tropica*, 69: 239-254.
- Macedo, A. M., Oliveira, R y Pena, S. 2002. Chagas disease: role of parasite genetic variation in pathogenesis. *Expert. rev. mol. med.* 1- 21.

- Michailowsky, V., Silva, M.N., Rocha, D.C., Vieira, Q.L., Lannes-Vieira, J y Gazzinelli, R.T. 2001. Pivotal Role of Interleukin-12 and Interferon- γ Axis in Controlling Tissue Parasitism and Inflammation in the Heart and Central Nervous System during *Trypanosoma cruzi* infection. *Am. J. Pathol.* 159: 1723-1733.
- Minoprio P. 2001. Parasite polyclonal activators: new targets for vaccination approaches? *Int. J. Parasitol.* 1: 588-91.
- Miles, M.A., Toyé, P.J., Oswald, S.C y Godfrey, D.G. 1977. The identification by isozyme patterns of two distinct strain-groups of *Trypanosoma cruzi*, circulating independently in a rural area of Brazil. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 71: 217-225.
- Moreno, N.N.J., Silva, J., Vercesi, A.E. y Docampo, R. 1994. Cytosolic free calcium elevation in *Trypanosoma cruzi* is required for cell invasion. *J. Exp. Med.* 180: 1535-1240.
- Morris, S.A., Tanowitz, H.B., Wittner, M y Bilezikian, J.P. 1990. Pathology insights into the Cardiomyopathy of Chagas disease. *Circulation.* 82: 1900:9
- Moretti, E., Basso, B., Cervetta, L., Brigada. A. y Barbieri, G. 2002. Patterns of cytokines and soluble cellular receptors and sera of children with acute Chagas disease. *Clin. Diagnos. Lab. Immunol.* 9: 1324-1327.
- Moser, B y Loetscher, P. 2001. Lymphocyte traffic control by chemokines. *Nat Immunol.* 2: 123-8.
- Mosmann, T.R. 1994. Properties and functions of interleukin-10. *Adv. Immunol.* 56: 1-26.
- Müller, U., köhler, G., Mossmann, H., Schaub, A., Alber, G., Di Santo, P.J., Brombacher, F. y Hölscher, C. 2001. IL-12 Independent IFN- γ Production by T Cells in Experimental Chagas' Disease is Mediated by IL-18. *J. Immunol.* 167: 3346-3353.
- OMS. 1991. *Control de la Enfermedad de Chagas*. Informes técnicos. Núm. 811. Ginebra. 106 pp.
- Ouassii, M.A y Capron, A. 1989. Some aspects of protozoan parasite-host cell interaction with special reference to RGD-mediated recognition process. *Microb. Pathology,* 6: 1-5
- Pereira, M.E y Krettli, A.U. 1990. The effect of reinoculation with trypomastigotes on the level of protective antibodies in mice chronically infected with *T. cruzi*. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 23: 283-92.
- Petkova, S.B., Huang, H., Factor, S.M., Pestell, R.G., Bouzahzah, B., Jelicks, L.A., Weiss, L.M., Douglas, S.A., Wittner, M y Tanowitz, H.B. 2001. The role of endothelin in the pathogenesis of Chagas' disease. *Int. J. Parasitol.* 31: 499-511.

- Piacenza, L., Peluffo, G y Radi, R. 2001. L- Arginine-dependent suppression of apoptosis in *Trypanosoma cruzi*: contribution of the nitric oxide and polyamine pathways. *Cell. Biology*. 98: 7301-7306.
- Pinge-Filho, P., Tadokoro, C.E. y Abrahamson, I.A. 1999. Prostaglandins mediate suppression of lymphocyte proliferation and cytokine synthesis in acute *Trypanosoma cruzi* infection. *Cell. Immunol.* 193:90-98.
- Pinto, D.J. 1984. *Enfermedad de Chagas: Epidemiología-clínica-Terapéutica. Programa de Salud Humana.* Buenos Aires, Argentina. 106 pp.
- Pinto, D.J. 1990. Cardiomiopatía Chagásica: Mito y Desafío. *Arch. Inst. Cardiol. Méx.* 60: 119-120.
- Powell, M.R. 1998. Cytokine mRNA levels in the hearts of inbred mice that develop different degrees of cardiomyopathy during infection with *T. cruzi*. *Paras. Immunol.*, 20, 463-471.
- Rangel-Flores, H., Sánchez, B., Mendoza-Duarte, J., Bernabé, C., Breniere, F.S., Ramos, C. y Espinoza, B. 2001. Serologic and Parasitologic Demonstration of *Trypanosoma cruzi* infections in an urban area of central México: correlation with electrocardiography alterations. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 65: 887-895.
- Rassi, A y Luquetti, A.O. 1992. *Therapy of Chagas disease.* In S Wendel, Z Brener, E Camargo, A Rassi (eds), *Chagas Disease (America Trypanosomiasis): its impact on Transfusion and Clinical Medicine.* ISBT, Sao Paulo, p. 237-247.
- Reed, S.G. 1988. In vivo administration of recombinant IFN-gamma induces macrophage activation and prevents acute disease, immune suppression. And death in experimental *Trypanosoma cruzi* infections. *J. Immunol.* 140:4342-4347.
- Reed, S.G., Brownell, C.E., Russo, D.M., Silva, J.S., Grabstein, K.H. y Morrissey, P.J. 1994. Interleukin-10 mediates susceptibility to *Trypanosoma cruzi* infection. *J. Immunol* 153: 3135-3140.
- Ribeirão, M., Pereira-Chioccola, V. L., Rénia, L., Filho, F. A. A., Schenkman, S y Rodrigues, M.M. 2000. Chagasic patients develop a type 1 immune response to *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase. *Paras. Immunol.* 22: 49-53.
- Rodríguez, A., Rioult, M.G., Ora, A., y Andrews, N.W. 1995. A Trypanosome-soluble factor induces IP3 formation, intracellular Ca²⁺ mobilization and microfilament rearrangement in host cells. *J. Cell. Biol.* 129: 1263-1273.

- Rodríguez, A., Webster, P., Ortego, J y Andrews, N.W. 1997. Lysosomes behave as Ca²⁺-regulated exocytic vesicles in fibroblasts and epithelial cells. *J. Cell.* 137:93-104.
- Roggero, E., Perez, A., Tamae-kakazu, M., Piazzon, I., Nepomnaschy, I., Wietzerbin, J., Serra, E., Revelli, S y Bottasso, O. 2002. Differential susceptibility to acute *Trypanosoma cruzi* infection in BALB/c and C57BL/6 mice is not associated with a distinct parasite load but cytokine abnormalities. *Clinic. Exp. Immunol.* 128: 421-428.
- Salazar-Schettino P.M., Haro, I., Tay, J., Bucio, M.I. y Robert, L. 1987. Estudio de la virulencia de cepas de *Trypanosoma cruzi* en el ratón blanco. *Rev. Mex. Páhol. Clinic.* 34: 105-109.
- Santos-Buch, A y Acosta, M.A. 1985. Pathology of Chagas Disease. In: *Immunology and Pathogenesis of Trypanosomiasis*. CRC Press, Inc. Boca Raron, Florida. P. 145-184.
- Schofield, C.J. 1985. Control of Chagas disease vectors. *Br. Med. Bull.* 41: 187-194
- Scharfstein, J. Schmitz, V., Morando, V. Capella, M.M., Lima, A.P., Morrot, A., Juliano, L y Muller-Esterl, W. 2000. Host cell invasion by *Trypanosoma cruzi* is potentiated by activation of bradykinin B (2) receptors. *J. Exp. Med.* 192: 1289-1300.
- Schenkman, S., Díaz, C y Nussenzweig, V. 1991. Attachment of *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes to receptors at restricted cell surface domains. *Exp. Parasitol.* 72: 76-86.
- Silva, J.S., Aliberti, J. C., Martins, G.A., Souza, M.A., Souto, J. T y Padua, M.A. 1998. The role of IL-12 in experimental *Trypanosoma cruzi* infection. *Braz. J. of Med. and Biol. Res.* 31: 111-115.
- Silva, J.S., Morrissey, P.J., Grabstein, K.H., Moler, K.M., Anderson, D. y Reed S.G 1992. Interleukin-10 and interferon γ regulation of experimental *Trypanosoma cruzi* infections. *The J. of immunol.* 140:4342.
- Soares, M.B.P., Silva-Mota, K.N., Lima, R.S., Bellintani, M.C., Ponte-de-Carvalho, L. y Ribeiro-dos-Santos. 2001. Modulation of Chagasic Cardiomyopathy by Interleukin-4. Dissociation between inflammation and tissue Parasitism. *Am. J. of Pathol.* 159: 703-709.
- Soares, M.B.P., De Carvalho, L.P y Ribeiro-Dos-Santos, R. 2001. The pathogenesis of Chagas disease: when autoimmune and parasite-specific immune response meet. *An. Acad. Bras. Cienc.* 73:4. 547-559.
- Souto, R.P., Fernandes, O., Macedo, A.M., Campbell, D.A y Zingales, B. 1996. DNA markers define two major phylogenetic lineages of *Trypanosoma cruzi*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 20 : 141-52

- Suckow, M.A., Weichbrod, R.H. and Douglas, F.A. 2001. *Management of Laboratory Animals Care and Use Programs*. CRC Press. Washington D.C. 147 pp.
- Talvani, A., Ribeiro, C. S., Aliberti, J. C. S., Michailowsky, V., Santos, P. V. A., Murta, S. M. F., Romanha, A. J., Almeida, I. C., Farber, J., Lannes-Vieira, J., Silva, J. S. y Gazzinelli, R. T. 2000. Kinetics of cytokine gene expression in experimental chagasic cardiomyopathy: tissue parasitism and endogenous IFN- γ as important determinants of chemokine mRNA expression during infection with *Trypanosoma cruzi*. *Microb. and Infec.* 2: 851-866.
- Tanowitz, H.B., Burns, E.R., Sinha, A.K., Kahn, N.N., Morris, S.A., Factor, S.M., Hatcher, V.B., Bilezikian, J.P., Baum, S.G y Wittner, M. 1990. Enhanced platelet adherence and aggregation in Chagas' disease: a potential pathogenic mechanism for cardiomyopathy. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 43: 274-81.
- Tarleton, R.L. 1990. Depletion of CD8⁺ T cells increases susceptibility and reverses vaccine-induced immunity in mice infected with *Trypanosoma cruzi*. *J. Immunol.* 144: 717.
- Tardieux, I., Nathanson, M.H. y Andrews, N.W. 1994. Role in host cell invasion of *Trypanosoma cruzi*-induced cytosolic free Ca²⁺ transients. *J. Exp. Med* 179: 1017-1022.
- Tarleton, R.L. Grusby, M.J, Postan, M., Glimcher, L.H. 1996. *Trypanosoma cruzi* infection in MHC-deficient mice: further evidence for the role of both class I-and class II –restricted T cells in immune resistance and disease. *Int. Immunol.* 8:13-22.
- Tarleton, R.L. 1997. *Immunity to Trypanosoma cruzi*. In: Haufmann SHE (editor), *Host Response to Intracellular Pathogens*. Landes Company, Austin, TX, 227-247.
- Tarleton, R.L y Zhang, L. 1999. Chagas disease etiology: Autoimmunity or parasite persistence? *Parasitol. Today* 15, 94-99.
- Tarleton, R.L. 2001. Parasite persistence in the etiology of Chagas disease. *Int. J. for Parasit.* 31: 550-554.
- Teixeira, M.M., Gazzinelli, R. y Silva, J. 2002. Chemokines, inflammation and *Trypanosoma cruzi* infection. *TRENDS in Parasitol.* 18: 262-265.
- Torrico, F., Heremans, H., Rivera, M.T., Van Marck, E., Billiau, A y Carlier, Y. 1991. Endogenous IFN-gamma is required for resistance to acute *Trypanosoma cruzi* infection in mice. *J. Immunol* 146: 3626-3632.

- Umekita, L. F., Takehara H.A y Mota I. 1988. Roll of the antibody Fc in the immune clearance of *Trypanosoma cruzi*. *Immunol. Lett*, 17: 85-89.
- Umekita, L. F. y Mota, I. 2000. How are antibodies involved in the protective mechanism of susceptible mice infects with *T. cruzi*?. *Braz. J. of Med. and Biol. Res.* 33: 253-258.
- Velasco, C. O., Guzmán, B. G., Rodríguez, J., López, O y González, F. 1991. La enfermedad de Chagas. *INDRE*. Dirección General de Epidemiología México D.F. *Publicación Técnica del INDRE*. No. 8.
- Viens, P., Dubois, R y Kongshavn, P.A. 1983. Platelet activity in immune lysis of *Trypanosoma muscui*. *Int J Parasitol.* 13: 527-30.
- Voller, A., Bidwel, D.E., and Bartlett, A. 1979. The Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA). A guide with abstract of microplate applications. 125 pp.
- World Bank 1993. *Investing in Health* (World Development Report 1993), Oxford University Press.
- WHO-World Health Organ Tech. Rep. Ser. 1991. Control of Chagas disease. Report of a WHO Expert Committee. Technical Report.
- Zárate, L. G. y Zárate, R. J. 1985 A checklist of the Triatominae (Hemiptera: Reduviidae) of Mexico. *Int. J. Entomol.* 27: 102-127.
- Zárate, L. G. y Zárate, R. J. 1980. The biology and behavior of *Triatoma barberi* (Hemiptera: Reduviidae) in Mexico. I. Blood sources and infection with *Trypanosoma cruzi*. *J. Med. Entomol.* 17: 103-116.
- Zhang L y Tarleton R.L. 1996 Characterization of cytokine production in murine *Trypanosoma cruzi* infection by in situ immunocytochemistry: Lack of association between susceptibility and type 2 cytokine productions. *Euro. J. Immunol.* 26: 102-109.
- Zhang L y Tarleton R.L. 1999. Parasite persistence correlates with disease severity and localization in chronic Chagas disease. *J. Infect Dis.* 180:480-486.

APÉNDICE 1. REACTIVOS UTILIZADOS EN TÉCNICA DE PROLIFERACIÓN DE CÉLULAS DE BAZO.

PREPARACIÓN DE MEDIO RPMI 1640.

Disolver un sobre de RPMI de 13.4 grs. en 900 ml de H₂O desionizada y adicionar 3.7 grs. por litro de NaCO₃ y ajustar el pH entre 7.1 y 7.3 con NaOH o HCl. Esterilizar por filtración al vacío en membrana de 0.2 µm. Vaciar el medio estéril en botellas de vidrio y dejar 48 hrs. como prueba de esterilidad a 37°C. Si durante la prueba de esterilidad el medio continúa siendo transparente y de color rojo proceder a complementar, agregando lo siguiente:

Para 1 litro de medio.

L- glutamina 100 grs. (Cat. No. 810-10511M)	al 1%	10 ml.
Aminoácidos no esenciales 10 mM 100X (Cat. No. 11140-019)	al 1%	10 ml.
Piruvato 100 mM (Cat. No. S-8636)	al 1%	10 ml.
Vitaminas 100X (Cat. No. 11120-052)	al 1%	10 ml.
Antibióticos 100X (Cat. No. 15240-062)	al 1%	10 ml.

Volver a filtrar la solución como anteriormente se hizo, agregar directamente la cantidad de suero fetal bovino, añadiendo 50 ml de suero a 500 ml de medio. (Los aminoácidos y las vitaminas ya están preparados para usarse).

PREPARACION DE BUFFER DE LISIS (ACK).

NH ₄ Cl	8.29 grs.
HHCO ₃	1 g.
Na ₂ EDTA	37.2 mg.

Se agregar los reactivos a 800 ml de agua destilada en un matraz aforado de 1Lt, una vez disueltos se ajusta el pH a 7.2 con HCl 1N y se afora a 1 Lt con agua destilada.

La solución se requiere estéril, por lo tanto se utilizó filtro estéril con membrana de 0.22µm y se almacenó en tubos Falcon a 4°C (Coligan, y cols., 2000).

APÉNDICE 2 TÉCNICA DE PROLIFERACIÓN CELULAR.

PROLIFERACIÓN DE CÉLULAS DE BAZO.

- Se extraen los bazos de los ratones de experimentación.
- Los bazos se lavan en cajas de petri Falcon de 60 X 15 mm con medio RPMI suplementado con suero fetal bovino 10%, NaCO₃, glutamina, piruvato, vitaminas, aminoácidos no esenciales y antibióticos (Apéndice 1).
- Los bazos se disgregaron con pinzas quitando la membrana principal.
- Se colecta el homogenizado con pipetas evitando los fragmentos grandes de estroma celular. Las células se colocan en tubos Falcon de 15 ml estériles, se dejan reposar por 20 minutos para sedimentar los restos celulares, entonces se obtiene sobrenadante que contienen las células y se centrifuga a 250 gs durante 10 minutos.
- El sobrenadante se desecha y al paquete celular se le agregan de 2 a 3 ml de solución de lisis ACK. Se deja actuar a 4°C durante 10 minutos con agitación suave.
- Posteriormente se agregan 5 volúmenes de RPMI, esta solución se centrifuga durante 10 minutos a 250 gs y se descarta el sobrenadante.
- El paquete celular se resuspende en 5 ml de medio RPMI y se cuenta el número de células en hemocitómetro con dilución de 1:100, posteriormente se ajusta el número de células a utilizar (200,000 células / pozo) y se resuspenden en 100 µl.
- Se colocan en placas Costar de 96 pozos de baja evaporación (Corning Incorporated No. Cat. 3595), sin utilizar los pozos exteriores.
- Posteriormente las placas se colocaron en la incubadora a 37°C, con 5% de CO₂ y 90% de humedad, durante 48 hrs. Finalmente las células se colocan a -70°C hasta su utilización para medir las citocinas en el sobrenadante de células de bazo.

APÉNDICE 3. SOBREVIVENCIA EN RATONES INFECTADOS CON 100 MIL PARÁSITOS DE CEPA B DE *T. cruzi*.

Día post infección (p.l.)	No. de ratones muertos/No. de ratones vivos.	Porcentaje (%) de sobrevivida en el 1er. experimento	No. de ratones muertos/No. de ratones vivos.	Porcentaje (%) de sobrevivida en el 2do. experimento	No. de ratones muertos/No. de ratones vivos.	Porcentaje (%) de sobrevivida en el 3er. experimento	•Número total de ratones muertos Ratones	*Número total de ratones vivos	Promedio de (%) de sobrevivida de 3 experimentos
0	(0/10)	100	(0/9)	100	(0/9)	100	0	28	100
2	(0/10)	100	(0/9)	100	(0/9)	100	0	28	100
3	(0/10)	100	(0/9)	100	(0/9)	100	0	28	100
4	(0/10)	100	(0/9)	100	(0/9)	100	0	28	100
6	(0/10)	100	(0/9)	100	(0/9)	100	0	28	100
10	(0/10)	100	(0/9)	100	(0/9)	100	0	28	100
14	(0/10)	100	(1/9)	89	(0/9)	100	1	27	96
18	(0/10)	100	(2/9)	78	(0/9)	100	2	26	93
21	(2/10)	80	(4/9)	55	(0/9)	100	6	22	75
23	(2/10)	80	(4/9)	55	(1/9)	88	7	21	71
25	(2/10)	80	(6/9)	33	(1/9)	88	9	19	68
26	(2/10)	80	(7/9)	22	(2/9)	77	11	18	61
29	(4/10)	60	(8/9)	11	(2/9)	77	14	14	50
31	(4/10)	60	(9/9)	0	(2/9)	77	15	13	46
36	(8/10)	20			(2/9)	77	18	10	36
39	(8/10)	20			(2/9)	77	18	10	36
43	(8/10)	20			(4/9)	55	21	7	25
47	(8/10)	20			(7/9)	22	24	4	14
49	(8/10)	20			(7/9)	22	24	4	14
50					(7/9)	22	24	4	14
53	(10/10)	0					26	2	7
54						0	28	0	0

Los ratones fueron mantenidos en grupos de 6 ratones en condiciones *ad limitum* de agua y alimentos y se revisaron diariamente registrándose la fecha y número de ratones muertos y vivos. El paréntesis indica el número total de ratones muertos durante el experimento / número total de ratones utilizados. •Número total de ratones muertos durante el experimento. *Número total de ratones vivos durante el experimento.

APÉNDICE 4. SOBREVIVENCIA DE RATONES INFECTADOS CON 10 MIL PARÁSITOS DE CEPA B DE *T. cruzi*.

Día post infección (p.i.)	No. de ratones muertos/No. de ratones vivos.	Porcentaje (%) de sobrevivida en el 1er. experimento	No. de ratones muertos/No. de ratones vivos.	Porcentaje (%) de sobrevivida en el 2do. experimento	No. de ratones muertos/No. de ratones vivos.	Porcentaje (%) de sobrevivida en el 3er. experimento	•Número total de ratones muertos	*Número total de ratones vivos	Promedio de (%) de sobrevivida de 3 experimentos
0	(0/10)	100	(0/9)	100	(0/9)	100	0	0	100
2					(0/9)	100	0	0	100
3	(0/10)	100	(0/9)	100	(0/9)	100	0	0	100
6	(0/10)	100	(0/9)	100	(0/9)	100	0	0	100
10	(0/10)	100	(0/9)	100	(0/9)	100	0	0	100
14	(0/10)	100	(0/9)	100	(0/9)	100	0	0	100
18	(0/10)	100	(0/9)	100	(0/9)	100	0	0	100
21	(2/10)	80	(0/9)	100	(0/9)	100	2	26	93
25	(2/10)	80	(1/9)	88	(0/9)	100	3	25	89
26	(2/10)	80	(1/9)	88	(0/9)	100	3	25	89
29	(2/10)	80	(2/9)	77	(1/9)	88	5	23	82
31	(4/10)	60	(4/9)	55	(2/9)	77	10	18	64
34	(4/10)	60	(4/9)	55	(3/9)	66	11	17	61
35			(6/9)	33	(3/9)	66	13	15	54
36	(4/10)	60	(6/9)	33	(3/9)	66	13	15	54
37	(4/10)	60	(6/9)	33	(3/9)	66	13	15	54
38	(6/10)	40	(7/9)	11	(3/9)	66	15	13	46
39	(6/10)	40	(9/9)	0	(3/9)	66	16	12	43
43	(6/10)	40			(4/9)	55	19	9	32
47	(8/10)	20			(4/9)	55	21	7	25
49	(8/10)	20			(4/9)	55	21	7	25
50	(8/10)	20			(5/9)	44	22	6	21
53	(10/10)	0							
54					(7/9)	22	26	2	7.1
55									
57					(9/9)	0	28	0	0

Los ratones fueron mantenidos en grupos de 6 ratones en condiciones *ad libitum* de agua y alimentos y se revisaron diariamente registrándose la fecha y número de ratones muertos y vivos. • Número total de ratones muertos durante el experimento / número total de ratones utilizados y porcentaje de ratones restantes. *Número total de ratones vivos durante el experimento.

APÉNDICE 5. PARASITEMIA EN SANGRE DE RATONES INFECTADOS CON 100 MIL PARÁSITOS DE CEPA VIRULENTE DE *T. cruzi*.

Días post infección.	Número de Individuos sangrados.	Parasitemia promedio del 1er experimento.	Número de Individuos sangrados.	Parasitemia promedio del 2do. exp.	Número de Individuos sangrados.	Parasitemia promedio del 2do. exp.	Parasitemia promedio de 3 experimentos.	Desviación Estándar.
0	36	0	36	0	36	0	0	n.c.
3	5	340	6	0	6	1000	925	n.c.
4			5	850				n.c.
6	5	280000	6	400000	6	266667	315556	73434
10	5	560000	6	666667	6	733333	653333	87432
14	5	1080000	5	1360000	4	1300000	1246667	147422
18	3	1333333	3	2666667	4	1400000	1800000	751295
21	4	2300000	4	4000000	4	3000000	3100000	854400
*25	3	3333333	3	4500000	4	4400000	*4077778	646644
29	3	2666667	2	4800000	3	3200000	3555556	1110222
32	2	2500000	0	0				
36	2	2000000			2	1050000	1525000	n.c.
39	2	600000			2	533333	566666	n.c.
43	2	200000			2	200000	200000	n.c.
47	0	0			2		0	n.c.

La parasitemia de los ratones se cuantificó en sangre del plexo ocular cada tercer día procurando no sangrar 2 veces a un mismo ratón para no producirles anemia. La parasitemia se contó en 10 μ l de sangre en un hemocitómetro en diluciones de 1:20 y 1:50 o gota directa. Se realizaron tres repeticiones, tomando de 2 a 6 ratones por grupo. El asterisco indica diferencias significativas entre cepas avirulenta y virulenta con el mismo inóculo. El análisis estadístico fue por medio de la prueba de X² con P<0.05. Las siglas n.c. indican que no se cálculo la desviación estándar.

APÉNDICE 6. PARASITEMIA EN SANGRE DE RATONES INFECTADOS CON 10 MIL PARÁSITOS DE CEPA VIRULENTE DE *T. cruzi*

Días post infección.	Número de Individuos sangrados.	Parasitemia promedio del 1er experimento.	Número de Individuos sangrados.	Parasitemia promedio del 2do. exp.	Número de Individuos sangrados.	Parasitemia promedio del 3er. exp.	Parasitemia promedio de 3 experimentos.	Desviación Estándar.
0	36	0	36	0	36	0	0	n.c.
3	5	106			3	102	104	n.c.
4			6	102				n.c.
6	5	420	6	517	5	460	465	48
10	5	540	6	400000	4	600000	333513	305210
14	4	600000	6	866667	3	1133333	866666	266666
18	3	733333	4	1150000	4	1100000	994444	227507
21	3	1600000	4	2500000	3	1800000	1966667	472581
*25	3	2333333	5	3360000	4	2425000	*2706111	568136
*29	3	2333333	5	3440000	3	2866667	*2880000	553454
32	3	1833333	3	3366667	3		2600000	n.c.
36	2	2666667	2	2100000	3	933333	1900000	883805
39	2	2000000	0		3	266667	2050000	n.c.
43	2	1033333	0		3	200000	616666	n.c.
47	2	333333	0					n.c.

La parasitemia de los ratones se cuantificó en sangre del plexo ocular cada tercer día procurando no sangrar 2 veces a un mismo ratón para no producirles anemia. La parasitemia se contó en 10 μ l de sangre en un hemocitómetro en diluciones de 1:20 y 1:50 o gota directa. Se realizaron tres experimentos, tomando de 2 a 6 ratones por grupo. Los asteriscos indican diferencias significativas entre cepa avirulenta y virulenta con el mismo inóculo. El análisis estadístico fue por medio de la prueba de χ^2 con $P < 0.05$. Las siglas n.c. indican que no se cálculo la desviación estándar.

APÉNDICE 7. PARASITEMIA EN SANGRE DE RATONES INFECTADOS CON 100 MIL PARÁSITOS DE CEPA AVIRULENTE DE *T. cruzi*.

Días post infección.	1er experimento		2do. Exp.		3er. exp.		Parasitemia promedio de 3 experimentos.	Desviación Estándar
	Número de Individuos sangrados.	Parasitemia promedio	Número de Individuos sangrados	Parasitemia promedio	Número de Individuos sangrados.	Parasitemia promedio		
0	36	0	36	0	36	0	0	n.c.
3	36	0	6	1400	6	0		n.c.
6	4	425	6	2800	6	1000	1408	1239
10	5	980	6	233333	6	333333	189215	170512
14	4	150325	6	300000	6	1166667	538997	548705
18	5	280000	6	600000	6	1133333	671111	431088
21	3	1133333	4	950000	4	1200000	1094444	129457
25	3	1133333	4	950000	4	1200000	1094444	129457
29	3	1900000	4	1050000	4	750000	1233333	596517
32	3	1600000	4	550000	4	250000	800000	708872
36	3	1600000	4	400000	4	100000	700000	793725
39	3	400000	4	200000	4	0	300000	n.c.
43	3	1333333	4	100000	3	0	116666	n.c.
47	3	0	4	0	3	0	0	n.c.
50	4	0	4	0	3	0	0	n.c.
53	3	0	4	0	3	0	0	n.c.
64	3	0	4	0	3	0	0	n.c.
71	4	0	4	0	3	0	0	n.c.
78	3	0	4	0	4	0	0	n.c.
81	3	0	4	0	4	0	0	n.c.
86	4	0	4	0	3	0	0	n.c.
93	3	0	4	0	4	0	0	n.c.
98	3	0	4	0	4	0	0	n.c.

La parasitemia de los ratones se cuantificó en sangre del plexo ocular cada tercer día procurando no sangrar 2 veces a un mismo ratón para no producirles anemia. La parasitemia se contó en 10 μ l de sangre en un hemocitómetro en diluciones de 1:20 y 1:50 o gota directa. Se realizaron tres repeticiones, tomando de 2 a 6 ratones por grupo. El análisis estadístico fue por medio de la prueba de χ^2 con $P < 0.05$. Las siglas n.c. indican que no se cálculo la desviación estándar.

APÉNDICE 8. PARASITEMIA EN SANGRE DE RATONES INFECTADOS CON 10 MIL PARÁSITOS DE CEPA AVIRULENTA DE *T. cruzi*

Días post infección.	1er experimento.		2do. experimento		3er. Experimento		Parasitemia promedio de 3 experimentos.	Desviación Estándar.
	Número de Individuos sangrados.	Parasitemia promedio	Número de Individuos sangrados	Parasitemia promedio	Número de Individuos sangrados	Parasitemia promedio		
0	36	0	36	0	36	0	0	n.c.
3	36	0	6	0	36	0	0	n.c.
6	6	0	6	1167	6	150	658	n.c.
10	4	250	6	1900	6	1583	1244	875
14	4	50375	6	200000	6	633333	294569	302766
18	5	400000	6	433333	6	800000	544444	221944
21	3	800000	3	800000	6	933333	844444	76980
25	4	850000	4	850000	4	950000	883333	57735
• 29	2	41000000	4	950000	4	300000	625000	n.c.
32	3	1600000	4	550000	4	200000	783333	728583
36	3	1600000	4	400000	4	0	1000000	n.c.
39	3	600000	4	150000	4	0	375000	n.c.
43	3	400000	4	100000	4	0	250000	n.c.
47	3	133333	3	0	3	0		n.c.
50	4	0	4	0	3	0		n.c.
53	3	0	3	0	3	0		n.c.
64	4	0	3	0	3	0		n.c.
71	4	0	4	0	3	0		n.c.
78	4	0	3	0	3	0		n.c.
81	4	0	4	0	3	0		n.c.
86	4	0	4	0	3	0		n.c.
93	4	0	4	0	3	0		n.c.
98	4	0	4	0	3	0		n.c.

La parasitemia de los ratones se cuantificó en sangre del plexo ocular cada tercer día procurando no sangrar 2 veces a un mismo ratón para no producirles anemia. La parasitemia se contó en 10µl de sangre en un hemocitómetro en diluciones de 1:20 y 1:50 o gota directa. Se realizaron tres repeticiones, tomando de 2 a 6 ratones por grupo. El punto significa un valor que se incrementó y no se volvió a tener uno similar y este suero se descartó para los posteriores experimentos. El análisis estadístico fue por medio de la prueba de X^2 con $P < 0.05$. Las siglas n.c. indican que no se calculó la desviación estándar.

APÉNDICE 9. ANTICUERPOS PRESENTES EN SUERO DE RATONES INFECTADOS CON 100 MIL PARÁSITOS DE CEPA VIRULENTE de *T. cruzi*.

Días post infección (pi).	Densidad Óptica (D.O.) en 490 nm de 1er.	Densidad Óptica (D.O.) en 490 nm de 2do. experimento.	Densidad Óptica (D.O.) en 490 nm de 3er. experimento.	Densidad Óptica promedio de 3 experimentos	Desviación estándar
0	0.187	0.178	0.096	0.153	0.04
1			0.095		n.c.
2		0.212			n.c.
3	0.259	0.313	0.371	0.314	0.04
6	0.605	0.453	0.24	0.432	0.149
10	0.471	0.445	0.239	0.385	0.01
14	0.405	0.399	0.23	0.344	0.099
18	0.536	0.553	0.409	0.499	0.078
21	0.663	0.711	0.39	0.588	0.14
25		0.822	0.382	0.602	n.c.
26			0.474		n.c.
29		0.89	0.494	0.674	n.c.
31		0.834			n.c.

La presencia de anticuerpos IgG en suero de los ratones infectados con 100 mil parásitos de la cepa virulenta, se determinaron mediante la técnica indirecta de ELISA, a partir del suero que se obtenía cada tercer día de los grupos infectados y grupo control, se tomaron de 3 a 6 ratones por grupo y se hicieron pools. El antígeno del parásito utilizado era de la cepa virulenta o avirulenta según el caso. Las siglas n.c. indican que no se cálculo la desviación estándar.

APÉNDICE 10. ANTICUERPOS PRESENTES EN SUERO DE RATONES INFECTADOS CON 10 MIL PARÁSITOS DE CEPA VIRULENTE DE *T. cruzi*.

Días post infección (pi).	Densidad Óptica (D.O.) en 490 nm de 1er.	Densidad Óptica (D.O.) en 490 nm de 2do. experimento.	Densidad Óptica (D.O.) en 490 nm de 3er. experimento.	Densidad Óptica promedio de 3 experimentos	Desviación estándar
0	0.187	0.178	0.096	0.153	0.04
1			0.104		
3	0.168	0.201	0.094	0.154	0.054
6		0.333	0.291	0.312	
10	0.41	0.477	0.312	0.399	0.082
14	0.328	0.35	0.268	0.315	0.042
18	0.349	0.354	0.272	0.325	0.045
21	0.45	0.46	0.371	0.427	0.048
25	0.523	0.628	0.405	0.518	0.111
29		0.715	0.523	0.619	
31		0.706			
36	0.6	0.74	0.465	0.6	0.137

La presencia de anticuerpos IgG en suero de los ratones infectados con 10 mil parásitos de la cepa virulenta, se determinaron mediante la técnica indirecta de ELISA, a partir del suero que se obtenía cada tercer día de los grupos infectados y grupo control, se tomaron de 3 a 6 ratones por grupo y se hicieron pools. El antígeno del parásito utilizado era de la cepa virulenta o avirulenta según el caso. Las siglas n.c. indican que no se cálculo la desviación estándar.

APÉNDICE 11. ANTICUERPOS PRESENTES EN SUERO DE RATONES INFECTADOS CON 100 MIL PARÁSITOS DE CEPA AVIRULENTE DE *T. cruzi*.

Días post infección (pi).	Densidad Óptica (D.O.) en 490 nm de 1er. experimento	Densidad Óptica (D.O.) en 490 nm de 2do. experimento.	Densidad Óptica (D.O.) en 490 nm de 3er. experimento.	Densidad Óptica promedio de 3 experimentos	Desviación estándar
0	0.187	0.216	0.185	0.196	0.02
3	0.271	0.251	0.179	0.233	0.05
9		0.417			n.c.
10	0.444	0.314	0.269	0.342	0.097
14	0.432	0.329	0.225	0.328	0.103
18	0.458	0.368	0.288	0.371	0.085
25		0.467	0.312	0.3895	n.c.
29	0.703	0.629	0.367	0.566	0.176
31	0.651	0.628	0.456	0.578	0.106
36			0.446		n.c.
39	0.611	0.898	0.536	0.681	0.191
43		0.96			n.c.
50	0.877	0.933	0.737	0.849	0.100
57		0.814	0.759	0.786	n.c.
64		0.866	0.877	0.871	n.c.
71		0.952	0.754	0.853	n.c.
78	0.777	0.99	0.932	0.899	0.110
81		0.991			n.c.
86		0.966			n.c.
93		0.982			n.c.
98		1.11			n.c.

La presencia de anticuerpos IgG en sueros de ratones infectados con 100 mil parásitos de la cepa avirulente, se determinaron mediante la técnica indirecta de ELISA, a partir del suero que se obtenía cada tercer día de los grupos infectados y grupo control se tomaron de 3 a 6 ratones por grupo y se hicieron pools. El antígeno del parásito utilizado era de la cepa virulente o avirulente según el caso. Las siglas n.c. indican que no se calculó la desviación estándar.

APÉNDICE 12. ANTICUERPOS PRESENTES EN SUERO DE RATONES INFECTADOS CON 10 MIL PARÁSITOS DE CEPA AVIRULENTE de *T. cruzi*.

Días post infección (pi).	Densidad Óptica (D.O.) en 490 nm de 1er. experimento.	Densidad Óptica (D.O.) en 490 nm de 2do. experimento.	Densidad Óptica (D.O.) en 490 nm de 3er. experimento.	Densidad Óptica promedio de 3 experimentos	Desviación estándar
0	0.187	0.211	0.18	0.192	0.016
3		0.385	0.124	0.254	n.c.
6	0.599	0.274	0.167	0.346	0.224
10	0.504		0.143	0.323	n.c.
14	0.451	0.315	0.191	0.319	0.130
18		0.457	0.197	0.327	n.c.
21	0.824	0.509	0.301	0.544	0.263
29		0.633	0.327	0.48	n.c.
31	1.252	0.951	0.413	0.872	0.425
36			0.465		n.c.
39	1.365	0.825	0.516	0.902	0.429
43		0.844			n.c.
47		0.867	0.456		n.c.
50	1.382	0.896	0.64	0.972	0.376
57		0.979	0.7	0.839	n.c.
64	1.319	1.083	0.74	1.047	0.291
78	1.34	1.021	0.75	1.037	0.295
81		1.037			n.c.
86		1.092	0.753	0.922	n.c.
98					

La presencia de anticuerpos IgG en sueros de ratones infectados con 10 mil parásitos de la cepa avirulente, se determinaron mediante la técnica indirecta de ELISA, a partir del suero que se obtenía cada tercer día de los grupos infectados y grupo control se tomaron de 3 a 6 ratones por grupo y se hicieron pools. El antígeno del parásito utilizado era de la cepa virulente o avirulente según el caso. Las siglas n.c. indican que no se calculó la desviación estándar.

APÉNDICE 13. TABLAS DE DENSIDAD ÓPTICA Y CONCENTRACIÓN DE CITOCINAS TH1 (IL-12 P40 E IFN-GAMMA) EN SUERO DE RATONES INFECTADOS CON 100 Y 10 MIL PARÁSITOS DE CEPAS VIRULENTE Y AVIRULENTE DE *T. CRUZI*.

13.1. Tabla de datos de densidad óptica de la citocina IL-12 p40 en el suero de los ratones infectados con diferentes cepas de *T. cruzi*.

		Experimento 1		Experimento 2			
Cepa y Carga	Día	Densidad óptica 450 nm	Prom. D.O	Desv. Est.			
Avirulenta 10 mil	0	0.127		0.023	0.03	0.06	0.058
	6	0.269	0.203	0.073	0.061	0.15	0.101
	10	0.259	0.223	0.088	0.084	0.16	0.09
	14	0.244	0.262			0.25	n.c.
	25			0.164	0.144	0.15	n.c.
	50			0.142	0.118	0.13	n.c.
	93	0.398	0.406	0.119	0.09	0.25	0.17
Virulenta 10 mil	6	0.508	0.473	0.121	0.123	0.3	0.21
	10	0.48	0.449	0.144	0.144	0.3	0.18
	18	0.565	0.442			0.5	n.c.
	25	0.471	0.468	0.123	0.128	0.29	0.19
	29			0.078	0.077	0.07	n.c.
Avirulenta 100 mil	6	0.141	0.13	0.056	0.05	0.09	0.047
	14	0.29	0.236	0.109	0.082	0.17	0.09
	18	0.188	0.191	0.102	0.083	0.14	0.056
	25			0.132	0.083	0.107	n.c.
	78			0.112	0.095	0.103	n.c.
	93	0.21	0.162	0.112	0.094	0.14	0.052
Virulenta 100 mil	6	0.321	0.31	0.097	0.105	0.2	0.12
	14	0.605	0.65	0.211	0.186	0.41	0.24
	18	0.455	0.504			0.47	n.c.
	21	0.443	0.364	0.16	0.125	0.27	0.15
	29				0.285	0.247	0.26

13.2. Tabla de datos de concentraciones de la citocina IL-12 p40 en el suero de los ratones infectados con diferentes cepas de *T. cruzi*.

Cepa y carga	Día	Experimento 1 Concentración pg/ml	Concentración pg/ml	Experimento 2 Concentración pg/ml	Concentración pg/ml	Concentración Promedio pg/ml	Desviación estándar
Avirulenta 10 mil	0	51		92	120	88	35
	6	577	435	304	254	392	093
	10	555	478	392	375	450	083
	14	523	562			542	
	25			732	642	687	n.c.
	50			633	526	579	n.c.
Virulenta 10 mil	93	934	953	531	401	704	280
	0	51		92	120	88	35
	6	1192	1110	540	544	846	353
	10	1126	1053	642	642	865	26
	18	1326	1037			1180	n.c.
	25	1105	1098	544	571	829	314
Avirulenta 100 mil	29			325	320	322	n.c.
	0	51		92	120	88	35
	6	275	253	233	208	242	028
	14	622	506	486	366	495	104
	18	403	409	455	370	409	34
	25			589	370	479	n.c.
Virulenta 100 mil	78			500	424	462	n.c.
	93	450	347	500	419	429	64
	0	51		92	120	88	35
	6	753	727	433	468	545	168
	14	1624	1744	814	718	1225	533
	18	1068	1183			1122	n.c.
Avirulenta 100 mil	21	1039	854	714	558	791	0.204
	29			1100	953	1026	n.c.

13.3. Curvas patrón utilizadas en experimento 1 y 2 para obtener las concentraciones de la citocina IL-12 p40 en el suero de los ratones infectados con diferentes cepas de *T. cruzi*.

Exp. 1								
Curva patrón								
Concentración pg/ml	0	12.5	25	50	100	200	400	800
Densidad óptica 450 nm	0	0.066	0.128	0.233	0.426	0.745	1.355	2.12
Exp. 2								
Curva patrón								
Concentración pg/ml	0	12.5	25	50	100	200	400	800
Densidad óptica 450 nm	0	0.031	0.06	0.112	0.259	0.493	0.912	1.559

13.4. Tabla datos de densidad óptica de la citocina INF- γ en el suero de los ratones infectados con diferentes cepas de *T. cruzi*.

Cepa y Carga	Día	Experimento 1		Experimento 2		Prom. D.O	Desv. est
		Densidad óptica 450 nm					
Avirulenta 10 mil	0	0.009	0.003	0.001		0.004	0.004
	3	0.018	0.012			0.015	n.c
	6	0.006	0.005	0.013	0.008	0.008	0.003
	10	0.291	0.285	0.203	0.216	0.24	0.045
	14	0.247	0.292			0.26	n.c
	18	0.373	0.587			0.48	n.c
	25	0.333	0.328	0.092	0.095	0.212	0.13
	50			0.01	0.001	0.005	n.c
	93	0.061	0.046	0.014	0.013	0.03	0.023
Virulenta 10 mil	3	0.003	0.004			0.003	n.c
	6	0.003		0.011	0.006	0.006	0.004
	10	0.724	0.622	0.388	0.378	0.52	0.17
	14	0.19	0.182	0.075	0.062	0.12	0.068
	18	0.066	0.058			0.062	n.c
	25	0.024	0.021	0.036	0.032	0.028	0.006
	29			0.025	0.033	0.012	n.c
	50	0.015	0.01			0.012	n.c
Avirulenta 100 mil	3	0.004	0.005			0.004	n.c
	6	0.025	0.024			0.024	n.c
	10	0.23	0.235	0.187	0.172	0.2	0.03
	14	0.4	0.365	0.213	0.205	0.29	0.1
	18	0.377	0.368			0.37	n.c
	21			0.02	0.023	0.02	n.c
	25	0.049	0.033	0.025	0.014	0.03	0.03
	36				0.011		n.c
	93	0.018	0.017			0.017	n.c
Virulenta 100 mil	3	0.413	0.451			0.43	n.c
	6	1.047	0.887		0.002	0.64	0.56
	14	0.013	0.033	0.532	0.514	0.27	0.28
	18	0.385	0.382	0.161	0.142	0.26	0.13
	25	0.109	0.094	0.045	0.03	0.069	0.037
	29			0.018	0.013	0.015	n.c
	36			0.013	0.02	0.016	n.c

13.5. Tabla de datos de concentraciones de la citocina INF- γ encontradas en suero de ratones infectados con diferentes cepas de *T. cruzi*.

Cepa y Carga	Dia	Experimento 1		Experimento 2			Desviación estandar
		Concentración pg/ml	Concentración pg/ml	Concentración pg/ml	Concentración pg/ml	Concentración Promedio pg/ml	
Avirulenta 10 mil	0	666	222	74		320	308
	3	1332	888			1100	n.c
	6	1110	925	801	592	857	217
	10	9603	9405	8750	9310	9267	365
	14	8151	9636			8893	n.c
	18	12310	19372			15841	n.c
	25	10990	10825	3829	3954	7399	4000
	50			616	740	678	n.c
	93	2782	2098	863	801	1636	969
Virulenta 10 mil	0	666	222	74		320	308
	3	1724	740			1232	n.c
	6	555		678	444	559	n.c
	10	22118	19002	20529	20000	20412	1301
	14	8667	8302	3161	2613	5685	3242
	18	3010	2645			2827	n.c
	25	1776	1554	1517	1348	1548	176
	29			1053	1391	1222	n.c
	50	1110	740			925	n.c
Avirulenta 100 mil	0	666	222	74		320	308
	3	740	925			832	n.c
	6	4625	4440			4532	n.c
	10	7590	7755	8060	7413	7704	275
	14	13201	12046	11269	10846	11840	1034
	18	12442	12145			12293	n.c
	21			843	969	906	n.c
	25	3626	2442	1053	863	1996	1121
	36			678			n.c
	53			444	518	481	n.c
Virulenta 100 mil	0	666	222	74		320	308
	3	962	2242			1602	n.c
	6	13630	14884	3829	3954	9074	6
	14	31985	27097	28148	27195	28606	2301
	18	12706	12607	6939	6120	9593	3553
	25	4972	4287	1896	1264	3104	1801
	29			1110	801	955	n.c
	36			801	1233	1017	n.c

13.6. Curva patrón utilizada para obtener la concentración de la citocina IFN- γ en suero de los ratones infectados con diferentes cepas de *T. cruzi*.

Exp. 1				
Concentración pg/ml	0	15	75	375
Densidad				
Optica 450nm	0	0.032	0.091	0.627
Exp. 2				
Concentración pg/ml	0	15	75	375
Densidad				
Optica 450nm	0	0.075	0.218	0.812

APÉNDICE 14. TABLAS DE DENSIDAD ÓPTICA Y CONCENTRACIÓN DE CITOCINAS TH1 (IL-10 E IL-4) EN SUERO DE RATONES INFECTADOS CON 100 Y 10 MIL PARÁSITOS DE CEPAS VIRULENTE Y AVIRULENTE DE *T. cruzi*.

14.1. Tabla de datos de densidad óptica de la citocina IL-10 en el suero de los ratones infectados con 10 mil parásitos de diferentes cepas de *T. cruzi*.

		Experimento 1		Experimento 2			
Cepa y Carga	Día	Densidad óptica 450 nm	Prom. D.O	Dev. Est.			
Avirulenta 10 mil	0	0.067	0.056	0.03	0.049	0.05	0.015
	6	0.035	0.049	0.031	0.101	0.05	0.032
	10	0.043	0.043	0.033	0.015	0.03	0.013
	14	0.009	0.009	0.006	0.002	0.006	0.0033
	21	0.013	0.013	0.018	0.001	0.011	0.007
	25	0.003	0.002	0.023	0.001	0.007	0.01
	93	0.058	0.047	0.024	0.001	0.032	0.025
Virulenta 10 mil	0	0.067	0.056	0.013	0.01	0.036	0.029
	6	0.123	0.086	0.029	0.038	0.069	0.043
	10	0.022	0.023	0.019	0.016	0.02	0.003
	18	0.017	0.019	0.013	0.017	0.016	0.002
	25	0.007	0.013	0.024	0.027	0.017	0.009
	29	0.103	0.1	0.039	0.022	0.066	0.041
	39			0.027	0.03	0.028	n.c.
Avirulenta 100 mil	0	0.067	0.056	0.03	0.049	0.05	0.015
	6	0.026	0.022	0.035	0.032	0.028	0.005
	14	0.021	0.014	0.039	0.007	0.02	0.013
	21	0.019	0.016	0.05	0.019	0.017	0.016
	25	0.01	0.013	0.034	0.024	0.02	0.01
	53	0.008		0.019	0.013	0.016	0.005
	93	0.044	0.032	0.005	0.006	0.021	0.019
Virulenta 100 mil	0	0.067	0.056	0.03	0.049	0.05	0.015
	3	0.01	0.008	0.035	0.038	0.022	0.015
	6	0.001	0.003	0.101	0.073	0.044	0.05
	14	0.007	0.003	0.008	0.012	0.007	0.003
	18	0.016	0.024	0.009	0.011	0.015	0.006
	21	0.009	0.013	0.028	0.004	0.013	0.01
	29	0.005	0.01	0.022	0.027	0.016	0.01
	31			0.037	0.034	0.0355	n.c.

14.2. Tabla de datos de concentración de la citocina IL-10 en el suero de los ratones infectados con 100 mil parásitos de dos diferentes cepas de *T. cruzi*.

		Experimento1		Experimento2			
Cepa y Carga	Día	Concentración pg/ml	Concentración pg/ml	Concentración pg/ml	Concentración pg/ml	Concentración Promedio pg/ml x 1000	Desviación estándar
Avirulenta 10 mil	0	688	575	168	274	426	245
	6	431	604	173	1273	620	469
	10	530	530	183	84	331	232
	14	1110	1110	33	11	566	628
	21	160	160	100	5.6	106	72
	25	37	24	128	5.6	48	54
	93	596	483	134	5.6	306	280
Virulenta 10 mil	0	688	575	168	274	426	245
	6	1264	883	162	213	63	535
	10	271	283	106	89	187	103
	18	209	234	72	95	152	80
	25	86	160	134	151	132	32
	29	1058	1027	218	123	606	505
Avirulenta 100 mil	0	688	575	168	274	426	245
	3	320	271	196	179	241	65
	6	259	172	218	39	172	95
	14	234	160	280	106	195	77
	21	123	160	190	134	151	29
	25	160	160	106	72	124	43
	78	98					n.c.
	93	542	394	28	33	249	259
Virulenta 100 mil	0	688	575	168	274	426	245
	3	123	98	196	213	157	55
	6	12	37	1273	920	560	630
	14	86	37	44	67	58	22
	18	197	296	50	60	150	117
	21	111	160	123	151	136	23
	29	616	123	207	190	284	224

14.3. Curvas patrón utilizadas para obtener las concentraciones de la citocina IL-10 en el suero de los ratones infectados con diferentes cepas de *T. cruzi*.

Experimento 1. Concentración pg/ml	0	37	111	333	1000	3000
Densidad óptica 450 nm	0	0.03	0.108	0.29	0.817	2.02
Experimento 2. Curva patrón Concentración pg/ml	0	37	111	333	1000	3000
Densidad óptica 450 nm	0	0.066	0.088	0.206	0.486	1.375

14.4. Tabla de datos de densidad óptica de la citocina **IL-4** en el suero de los ratones infectados con diferentes cepas de *T. cruzi*.

IL-4	Cepa y carga	Experimento 1		Experimento 2			Desv. estand
		Día	Densidad Óptica	Densidad Óptica	Densidad Óptica	Densidad Óptica	
Avirulenta 10 mil	0	0.085	0.084	0.092	0.103	0.091	0.008
	6	0.115	0.133	0.079	0.136	0.115	0.026
	10	0.69	0.084				n.c.
	14	0.116	0.112	0.222	0.32	0.193	0.099
	18	0.102	0.146			0.124	
	21	0.204	0.201	0.141	0.221	0.191	0.034
	25	0.253	0.294			0.273	
	29	0.779	0.763	0.404	0.391	0.584	0.215
	36	0.492	0.434	0.545	0.546	0.504	0.053
	43	0.143	0.233	0.556	0.689	0.405	0.259
	57	0.375	0.427			0.401	n.c.
	71	0.379	0.418			0.398	n.c.
	78	0.232	0.594			0.413	n.c.
	86	0.454	0.416			0.435	n.c.
	Virulenta 10 mil	93	0.461	0.47	0.421	0.395	0.436
3		0.04	0.034	0.139	0.163	0.094	0.066
6		0.02	0.02	0.111	0.108	0.064	0.051
10		0.116	0.149			0.132	n.c.
14		0.12	0.167	0.212	0.207	0.176	0.042
18		0.112	0.11	0.28	0.371	0.218	0.129
21		0.094	0.098	0.203	0.261	0.164	0.82
25		0.124	0.18	0.499	0.587	0.347	0.229
100 mil Avirulenta	36	0.193	0.165	0.567	0.51	0.358	0.209
	3	0.096	0.079			0.087	n.c.
	6	0.074	0.074	0.153	0.178	0.119	0.053
	10	0.11	0.138			0.124	n.c.
	14	0.101	0.13	0.257	0.289	0.194	0.092
	18	0.119	0.127			0.123	n.c.
	21	0.082	0.089	0.33	0.354	0.213	0.148
	25	0.169	0.15			0.159	n.c.
	29			0.266	0.244	0.295	n.c.
	36			0.28	0.311	0.295	n.c.
	43	0.147	0.195	0.472	0.455	0.317	0.17
	78	0.115	0.137			0.126	n.c.
	86	0.129	0.204			0.126	n.c.
	93	0.127	0.127	0.448	0.65	0.338	0.257
	Virulenta 100 mil	3	0.044	0.046	0.13	0.123	0.085
6		0.07	0.098	0.123	0.173	0.238	0.043
10		0.182	0.193	0.266	0.311	0.238	0.061
14				0.337	0.389	0.363	n.c.
18				0.522	0.497	0.509	n.c.
21		0.211	0.217	0.544	0.546	0.379	0.191
25		0.098	0.111	0.465	0.509	0.295	0.221
29		0.151	0.134	0.438	0.473	0.299	0.181

14.5. Tabla de datos de concentración de la citocina **IL-4** en el suero de los ratones infectados con diferentes cepas de *T. cruzi*.

Cepa y Carga	Dia	Experimento 1		Experimento 2		Concentración Promedio pg/ml x 1000	Desv. estand
		Concentración pg/ml	Concentración pg/ml	Concentración pg/ml	Concentración pg/ml		
Avirulenta	0	568	618	217	242	0.411	0.211
10 mil	6	947	1096	158	272	0.618	0.472
	10	568	692			0.63	n.c.
	14	956	923	763	1100	0.935	0.138
	18	840	1203			1021.5	n.c.
	21	1681	1656	485	760	1145.5	0.614
	25	2085	2423			2254	n.c.
	29	4659	4563	1389	1385	2999	1861
	36	2942	2595	1875	1878	2322.5	0.534
	43	1178	1920	2875	3181	2288.5	0.934
	57	2242	2553			2397.5	n.c.
	71	2266	2500			2383	n.c.
	78	1912	3552			2732	n.c.
	86	2715	2488			2601.5	n.c.
	93	2757	2811	1448	1358	2093.5	0.798
Virulenta	0	568	618	217	242	0.411	0.211
10 mil	3	187	159	478	560	0.346	0.202
	6	93		381	371	0.371	0.163
	10	956	1228			1092	n.c.
	14	989	1376	729	712	0.951	0.31
	18	923	906	963	1276	1017	0.174
	21	774	807	698	897	0.794	0.082
	25	1021	1483	1716	2019	1559.75	0.42
	39	1590	1359	1950	1754	1663.25	0.25
Avirulenta	0	568	618	217	242	0.411	0.211
10 mil	3	791	651			0.721	n.c.
	6			526	612	0.569	n.c.
	10	609	609			0.609	n.c.
	14	906	1137	884	994	0.994	0.114
	18	832	1071			0.951	n.c.
	21	980	1046	1135	1217	1906	0.103
	25	675	733			0.704	n.c.
	29			915	839	0.877	n.c.
	36			963	1069	1010	n.c.
	43			1623	1565	1594	n.c.
	53	1211	1607			1409	n.c.
	78	947	1129			1038	n.c.
	86	1063	1681			1372	n.c.
	93	1046	1046	1541	2236	2236	0.563
Virulenta	0	568	618	217	242	0.411	0.211
10 mil	3	206	215	447	423	0.322	0.13
	6	576	807	84	74	0.385	0.366
	10	1500	1590	246	346	0.92	0.723
	14			1154	1338	1246	n.c.
	18			2410	1709	2059.5	n.c.
	21	1739	1788	2512	2521	2140	0.435
	25	807	914	1599	1751	1267.75	0.476
	29	1244	1104	1506	1627	1370.25	0.238

14.6 curva patrón utilizada para obtener la concentración de la citocina IL-4 en suero de los ratones infectados con diferentes cepas de *T. cruzi*.

Curvas patrón				
Exp. 1				
Concentración pg/ml	0	15	75	375
Densidad				
Optica 450nm	0	0.032	0.091	0.627
Exp. 2				
Concentración pg/ml	0	15	75	375
Densidad				
Optica 450nm	0	0.075	0.218	0.812

APÉNDICE 15. CITOCINAS TH1 (IFN-GAMMA E IL-12 P40) EN SOBRENADANTES DE CÉLULAS DE BAZO DE LOS RATONES INFECTADOS CON 100 MIL PARÁSITOS DE CEPAS VIRULENTA Y AVIRULENTA DE *T. cruzi*.

15.1 Tabla de datos de densidad óptica y curva patrón de citocina IL-12 p40 en el sobrenadante de células de bazo de ratones infectados con 100 mil parásitos de ambas cepas de *T. cruzi*.

IL-12 p40				
		Control	Aguda	Crónica
		Concentración	Concentración	Concentración
		pg/ml	pg/ml	pg/ml
Avirulenta	Experimento 1	0.007	0.006	0.006
		0.005	0.04	0.004
Virulenta	Experimento 1	0.007	0.003	
		0.005	0.004	

Curva patron		
Experimento 1	D. O. 450 nm	Concentración pg/ml
Experimento 1	0	0
	0.035	37
	0.11	111
	0.29	333
	0.781	1000
	2.036	3000
Experimento 2	0	0
	0.007	37
	0.053	111
	0.157	333
	0.475	1000
	1.304	3000

15.2. Tabla de concentración de la citocina IL-12 p40 en el sobrenadante de las células de bazo de los ratones infectados con 100 mil parásitos de ambas cepas de *T. cruzi*.

IL-12 p40				
Cepa		Control	Aguda	Crónica
		Concentración	Concentración	Concentración
		pg/ml	pg/ml	pg/ml
Avirulenta	Experimento 1	28	24	24
		20	16	16
	Promedio	24	20	20
Virulenta	Experimento 1	12	12	
		16	16	
	Promedio	14	14	

15.3. Tabla de datos de densidad óptica de la citocina INF-Gamma en el sobrenadante de células de bazo de ratones infectados con 100 mil parásitos de ambas cepas de *T. cruzi*.

INF-Gamma		Control Densidad óptica pg/ml	Aguda Densidad óptica pg/ml	Crónica Densidad óptica pg/ml
Avirulenta	Experimento 1	0.001	0.005	0.003
		0.003	0.004	0.007
	Experimento 2	0.001	0.009	0.009
		0.002	0.008	
	Promedio	0.00175	0.0065	0.006
	Desv estand	0.005	0.002	0.003
Virulenta	Experimento 1	0.001	0.014	
		0.003	0.009	
	Experimento 2	0.012	0.01	
		0.002		
	Promedio	0.0045	0.011	
	Desv estand	0.005	0.002	

15.4. Tabla de concentración de la citocina INF-Gamma en sobrenadante de las células de bazo de los ratones infectados con 100 mil parásitos de ambas cepas de *T. cruzi*.

INF-Gamma		Control Concentración pg/ml	Control Concentración pg/ml	Control Concentración pg/ml
Avirulenta	Experimento 1	30	154	92
		92	123	215
	Experimento 2	30	277	277
		61	246	
	Promedio	53	200	194
	Desv estand	29	73	94
Virulenta	Experimento 1	30	914	
		92	277	
	Experimento 2	370	308	
		61		
	Promedio	138	499	
	Desv estand	156	112	

APÉNDICE 16. CITOCINAS TH2 (IL-10 E IL-4) EN SOBRENADANTES DE CÉLULAS DE BAZO DE LOS RATONES INFECTADOS CON 100 MIL PARÁSITOS DE CEPAS VIRULENTE Y AVIRULENTE DE *T. cruzi*.

16.1. Tabla de datos de densidad óptica de citocina IL-10 en el sobrenadante de células de bazo de ratones infectados con 100 mil parásitos de ambas cepas de *T. cruzi*.

IL-10		Control Concentración pg/ml	Aguda Concentración pg/ml	Crónica Concentración pg/ml
Avirulenta	Experimento 1	0.006	0.001	0.001
		0.005		0.003
	Experimento 2	0.024	0.04	0.025
		0.013	0.014	0.034
	Promedio	0.012	0.018	0.015
	Desv estand	0.008	0.019	0.016
Virulenta	Experimento 1	0.006	0.004	
		0.005	0.001	
	Experimento 2	0.024	0.019	
		0.013	0.021	
	Promedio	0.012	0.011	
	Desv estand	0.008	0.01	

16.2. Tabla de concentración de citocinas en sobrenadante de las células de bazo de los ratones infectados con 100 mil parásitos de ambas cepas de *T. cruzi*.

IL-10		Control Concentración pg/ml	Aguda Concentración pg/ml	Crónica Concentración pg/ml
Avirulenta 100 mil	Experimento 1	63	10	10
		52		31
	Experimento 2	502	837	523
		272	293	712
	Promedio	222	380	319
	Desv estand	212	320	353
Virulenta 100 mil	Experimento 1	63	42	
		52	10	
	Experimento 2	502	397	
		272	439	
	Promedio	222.25	222	
	Desv estand	212	227	

16.3. Tabla de datos de densidad óptica de citocina IL-4 en el sobrenadante de células de bazo de ratones infectados con 100 mil parásitos de ambas cepas de *T. cruzi*.

IL-4		Control Concentración pg/ml	Aguda Concentración pg/ml	Crónica Concentración pg/ml
Avirulenta 100 mil	Experimento 1	0.006	0.019	
		0.003	0.026	0.003
	Experimento 2	0.003	0.111	0.003
		0.002	0.033	0.024
	Promedio	0.0035	0.04725	0.01
Desv estand	0.0017	0.042	0.012	
Virulenta 100 mil	Experimento 1	0.006	0.002	
		0.003	0.006	
	Experimento 2	0.03	0.005	
		0.02	0.005	
	Promedio	0.014	0.0045	
Desv estand	0.012	0.0017		

Tabla de concentración de la citocina IL-4 en sobrenadante de las células de bazo de los ratones infectados con 100 mil parásitos de ambas cepas de *T. cruzi*.

IL-4		Control Concentración pg/ml	Aguda Concentración pg/ml	Crónica Concentración pg/ml
Avirulenta 100 mil	Experimento 1	26	81	
		12	111	12
	Experimento 2	5	205	5
		3	61	44
	Promedio	11	☆114	20
Desv estand	10	63	20	
Virulenta 100 mil	Experimento 1	26	8	
		12	26	
	Experimento 2	5	9	
		3	9	
	Promedio	11	13	
Desv estand	10	8		

La estrella indica diferencias significativas entre ambas cepas y grupo control.